UNIVERSITÉ DE LAUSANNE – FACULTÉ DE MÉDECINE
INSTITUT DE MICROBIOLOGIE – Directeur: Professeur V. BONIFAS

Étude de quelques inhibiteurs et des conditions de croissance permettant l'isolement sélective de *Listeria monocytogenes*

THÈSE

présentée à la Faculté de Médecine de
l'Université de Lausanne
pour l'obtention du grade de docteur en médecine

par

PÉRICLÈS MAVROTHALASSITIS
Médecin diplômé de l'Université de Thessalonique (Grèce)
originaire de Grèce

Juris Druck + Verlag Zürich
1977

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE – FACULTÉ DE MÉDECINE
INSTITUT DE MICROBIOLOGIE – Directeur: Professeur V. BONIFAS

Étude de quelques inhibiteurs et des conditions de croissance permettant l'isolement sélective de *Listeria monocytogenes*

THÈSE

présentée à la Faculté de Médecine de
l'Université de Lausanne
pour l'obtention du grade de docteur en médecine

par

PÉRICLÈS MAVROTHALASSITIS
Médecin diplômé de l'Université de Thessalonique (Grèce)
originaire de Grèce

Juris Druck + Verlag Zürich
1977

Université de Lausanne

Faculté de Médecine

Le Conseil de la faculté de médecine de l'Université de Lausanne, après avoir pris connaissance des rapports favorables de M. le professeur

V. BONIFAS et M. le Dr N. ODARTCHENKO, privat-docent,

et sans se prononcer sur les opinions du candidat, autorise l'impression de la thèse intitulée:

"ETUDE DE QUELQUES INHIBITEURS ET DES CONDITIONS DE CROISSANCE PERMETTANT L'ISOLEMENT SELECTIVE DE LISTERIA MONOCYTOGENES",

présentée par Monsieur Périclès MAVROTHALASSITIS,

Médecin diplômé de l'Université de Thessalonique,

pour l'obtention du grade de Docteur en médecine.

Lausanne, le 1o juin *19* 77

UNIV. LEIDEN BIBL.

Le Doyen:

Prof. G. Favez

A mon père,

en témoignage de mon affection
et de ma reconnaissance pour
les sacrifices qu'il a consenti
à mon égard.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546809_0008

A Monsieur le Professeur V. Bonifas,

qui, par son vif intérêt pour la recherche scientifique, fut à l'origine de ce travail.

Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour la confiance qu'il a bien voulu m'accorder et pour le temps précieux qu'il a su consacrer pour me guider dans mon travail.

TABLE DES MATIERES

Avant - propos IX

PREMIERE PARTIE

Introduction 3

1.1. Etude bactériologique de Listeria monocytogenes 5
1.1a. Taxonomie 5
1.1b. Morphologie 8
1.1c. Culture 9
1.1d. Caractères biochimiques 10
1.1e. Composition chimique 11
1.1f. Structure antigénique 12
1.1g. Formes L 14
1.1h. Phages 15

1.2. Pathogénie 17
1.2.a. Listériose des animaux 23
1.2.b. Listériose de l'homme 24

1.3. Epidémiologie 26

1.4. Immunologie 30

1.5. Sérologie 33

1.6. Isolement de L. monocytogenes 36

DEUXIEME PARTIE

Introduction 41

2.1. Matériel et méthodes 43
2.1a. Souches bactériennes 43
2.1b. Milieux 43
2.1c. Produits chimiques testés 44

2.2. Résultats 46
2.2a. Méthode d'isolement sélectif de L. monocytogenes 46

2.3. Discussion et conclusion 61

2.4 Résumé 63

Bibliographie 64

Avant - propos

Dans l'histoire relativement courte de la Microbiologie, le cas de Listeria monocytogenes est quelque peu particulier. En effet, il n'y a pas beaucoup d'espèces bactériennes dont l'étude aie suscité autant de controverses au sein d'une minorité de chercheurs passionnés, alors que l'intérêt des autres restait plutôt mitigé.

Les premières rencontres fortuites de quelques chercheurs avec ce petit bacille ont eu lieu à l'aube de ce siècle et les premières annonces, timides et prudentes, furent noyées dans la masse des publications "d'intérêt majeur" sur les sujets qui préoccupaient les microbiologistes de l'époque. Mais ces pionniers, nullement découragés, ont continué, souvent indépendamment les uns des autres, à collecter leurs observations, dans le silence de leurs laboratoires ou l'isolement de leurs expéditions, sur cette bactérie peu connue aux propriétés étranges. Pour qu'on procède à une étude plus approfondie, il a fallu l'apparition d'une épizootie parmi les animaux de l'"animalerie" d'un groupe de chercheurs de l'Université de Cambridge. Ce groupe, dirigé par E.G.D. Murray, et travaillant, à l'époque, sur les méningocoques, possédait une "animalerie", réputée "immunologiquement inviolable", dessinée expressément et organisée suivant les standards bactériologiques et véterinaires les plus élevés. Rien n'était négligé, rien n'était laissé au hasard. Pourtant, Listeria monocytogenes, défiant les contrôles les plus sévères, a pu se glisser à l'intérieur. Par quel moyen, par quel chemin détourné ceci a-t-il pu se produire? Ce fut un des premiers mystères concernant cette bactérie et ce n'est qu'aujourd'hui qu'on commence à entrevoir les modalités de sa distribution et les voies de contamination. En tout cas, cette aventure a débouché, en 1926, sur une publication magistrale de Murray et de son équipe, qui demeure aujourd'hui encore, l'exemple type d'une étude bactériologique. Cet article servit longtemps de point de référence et il fut à l'origine de contacts directs et personnels entre tous ceux dont la passion commune était ce petit bacille gram positif qui, à l'extérieur de cette petite communauté, fut

longtemps ignoré ou considéré comme une simple curiosité de laboratoire. Ces contacts créèrent, petit à petit, une atmosphère particulière au sein de la communauté des "listériologues", où l'amitié et le respect réciproque ne sont pas des notions secondaires. Et cette atmosphère transpire jusque dans les publications scientifiques où, entre les lignes austères et concises, on a l'agréable surprise de pouvoir lire des phrases comme: "But over a friendly glass of cool wine in a cozy cafe in West Berlin (this story) was told like this: it was 1951 ...." (24).

Cette "Listeria-minded community", étant ainsi créée "de facto", ses membres ont ressenti le besoin de se trouver entre eux pour confronter leurs connaissances et échanger leurs idées, à l'écart des circuits des communications traditionnelles d'un système qui demeurait encore relativement indifférent à l'égard de L. monocytogenes. Ce besoin aboutit, en 1957, au premier Symposium International sur L. monocytogenes. Les participants étaient loin, à cette époque, d'imaginer toute la portée de leur initiative et la longue série des rencontres internationales qui allaient suivre ce premier symposium: Bozeman, Montana, U.S.A., 1962; Bilthoven, Utrecht, Pays-Bas, 1966; Leipzig, Allemagne de l'Est, 1969; Pécs, Hongrie, 1972; Nottingham, Angleterre, 1974.

Cette série de rencontres allait faire émerger définitivement L. monocytogenes comme un pathogène significatif, non seulement pour les animaux comme on le croyait jusqu'alors, mais également pour l'homme; mettre en évidence l'importance et la fréquence de la listériose périnatale; faire le point sur les problèmes posés par cette bactérie et tracer les lignes générales de la recherche, et, surtout, faire ressortir d'une manière claire et documentée ce que les premiers passionnés de L. monocytogenes avaient déjà confusément soupçonné: que son étude dépasse largement le cadre de la recherche sur un simple agent infectieux; que cette bactérie constitue un instrument pour l'étude des parasites bactériens intracellulaires, de la réponse immunitaire spécifique ou de la tolérance immunitaire. En outre, il est apparu que L. monocytogenes pourrait également constituer un modèle utile, pour l'ex-

ploration et la meilleure compréhension de situations aussi complexes que les maladies "auto-immunes" ou le cancer (66).

Cinquante ans ont passé depuis la description de L. monocytogenes par Murray et ses collaborateurs. La première génération des "listériologues" compte déjà ses morts: E.G.D. Murray, l'initiateur, M.L. Gray, connu comme "Mr. Listeria", pour le volume et l'importance de ses travaux sur cette bactérie, A Nyfeldt, E. Roots et tant d'autres qui ont su travailler patiemment pour enrichir nos connaissances et qui furent à l'origine de tant de vocations. Mais les fruits de leur travail demeurent: la recherche sur L. monocytogenes et ses fascinantes propriétés biologiques prend une ampleur considérable et les perspectives qu'elle ouvre sont toutes plus intéressantes les unes que les autres.

Le travail présent comporte une première partie dans laquelle nous avons essayé de faire le point sur les acquisitions récentes concernant L. monocytogenes et sur les perspectives qui s'en dégagent.

Dans la deuxième partie, notre travail personnel est exposé. Il s'agit d'une étude de procédures et d'inhibiteurs par lesquels la croissance de toutes les espèces bactériennes est réprimée à l'exception de celle de L. monocytogenes.

Première partie

Introduction

Si la publication de Murray et de son équipe, en 1926, peut être considérée comme l'acte de naissance de L. monocytogenes, nous sommes actuellement à peu près sûrs que la bactérie a été observée bien avant cette date (24,72). Ainsi, en 1891, Hayem en France et, en 1893, F. Henle en Allemagne ont observé des bacilles gram positifs, isolés de tissus de malades morts d'une maladie qui, rétrospectivement, peut être considérée comme une listériose.

G. Hülphers semble être le premier à avoir étudié, en 1911, la bactérie que nous connaissons aujourd'hui sous le nom de L. monocytogenes. Il l'a isolée dans les lésions hépatiques de lapin et il lui a donné le nom de Bacterium hepatis.

J. Dumont et L. Cotoni décrivent, en 1921, une souche bactérienne qu'ils avaient isolée d'un cas de méningite. La souche a été préservée à l'Institut Pasteur de Paris et alle a ainsi pu être identifiée, 20 ans après, par J. St. Paterson comme L. monocytogenes (72).

E.G.D. Murray et son groupe, dans leur brillante description de 1926 (59), proposent, pour la bactérie décrite, le nom de Bacterium monocytogenes, en attirant ainsi l'attention sur l'augmentation considérable et sélective des monocytes dans le sang des animaux infectés.

Une année plus tard, en 1927, J.H.H. Pirie isole une bactérie gram positif chez les gerbilles de l'Afrique du Sud et, impressionné par les lésions hépatiques, il propose le nom de Listerella hepatolytica.

Mentionnons, enfin, la bactérie isolée par les premiers cas de listériose humaine connus, en 1929, par A. Nyfeldt, qui proposa le nom de Bacterium monocytogenes hominis.

Le fait que les premiers isolements de L. monocytogenes provenaient d'animaux a largement contribué à l'établissement de l'opinion que la listériose n'était qu'une maladie animale qui pourrait, en cas d'épizootie, avoir éventuellement une importance économique (23). Cette attitude persista longtemps et ce n'est qu'après la deuxième guerre mon-

diale que la listériose et ses multiples aspects furent sérieusement considérés en pathologie humaine. Cette évolution est assez bien reflétée par le nombre et la fréquence des cas de listériose humaine reconnus dans différents pays, pendant les 20 dernières années. Ainsi, pour ne prendre qu'un seul exemple, en Allemagne, avant 1960, il y avait 500 cas de listériose humaine diagnostiqués et leur nombre a passé, en 1967, à 2000 (10). Cette augmentation ne peut pas être expliquée uniquement par l'amélioration des méthodes de recherche et d'isolement de la bactérie. On peut raisonnablement considérer que le fait de penser à la listériose et de rechercher L. monocytogenes a largement contribué au diagnostic de la maladie.

Il est pratiquement certain que cette bactérie a dû être, pendant longtemps, confondue et écartée, principalement à cause de sa morphologie, comme "contaminant" ou "pseudodiphtérique" (24).

Aujourd'hui, on reconnaît L. monocytogenes comme une bactérie ubiquitaire, très largement diffusée dans la nature, pathogène pour les animaux, ainsi que pour l'homme. Mais de nombreux aspects de son épidémiologie, des voies de contamination, des facteurs dont dépend la manifestation de la maladie, ainsi que des relations hôte-bactérie restent à définir.

1.1. Etude bactériologique de Listeria monocytogenes

1.1a. Taxonomie

La multitude des noms sous lesquels la nouvelle bactérie a été décrite créa une confusion grandissante, à tel point que le IIIe Congrès International de Microbiologie, tenu en 1939 à New York, a du trancher, en acceptant la proposition de J.H.H. Pirie: Listeria monocytogenes, en l'honneur de Lord Lister, père de la chirurgie antiseptique.

Quelques synonymes, qu'on trouve surtout dans la littérature antérieure à 1957, (année du premier Symposium International sur L. monocytogenes) sont (24): Bacterium hepatis (Hülphers, 1911), Bacterium monocytogenes (Murray et al., 1926), Listerella hepatolytica (Pirie, 1927), Listerella monocytogenes hominis (Nyfeldt, 1932), Corynebacterium parvulum (Schultz et al., 1934), Listerella ovis (Gill, 1937), Corynebacterium infantisepticum (Potel, 1950), Listeria infantiseptica (Potel, 1952).

Si le problème posé par la nomenclature de L. monocytogenes a pu être résolu d'une manière relativement facile, sa position taxonomique a fait surgir des problèmes autrement plus complexes, problèmes qui, aujourd'hui encore, sont très loin d'être résolus. Voici quelques données de ces problèmes:

L. monocytogenes fut incorporée, d'abord, dans la famille des Corynebacteriaceae qui était composée ainsi, de six genres: Corynebacterium, Listeria, Erysipelothrix, Microbacterium, Cellulomonas et Arthrobacter (10). L. monocytogenes était l'unique espèce du genre Listeria. Ceci devait, plus tard, se modifier par la découverte et la description de bactéries très proches de L. monocytogenes, auxquelles on a attribué le statut d'espèce. Ainsi, Prévot, en 1961, décrit Listeria denitrificans, une listéria réduisant le nitrate en nitrite (76). Larsen et Seeliger, en 1966, décrivent Listeria grayi qui fermente le mannitol (76).

Enfin, Welshimer et Meredith, en 1971, décrivent Listeria murrayi qui réduit le nitrate et fermente le mannitol (90, 76). Les caractères différentiels de ces quatre espèces de Listeria sont résumés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Caractères différentiels des espèces de Listeria (76, 90).

	Listeria monocytogenes	Listeria denitrificans	Listeria grayi	Listeria murrayi
Nitrate	-	+	-	+
Voges-Proskauer	+	-	+	+
Hémolyse β	+	-	-	-
Granules métachromatiques	-	+	-	-
Pathogène pour la souris	+	+ (?)	-	-
% GC	38	56±1	38±1	38±1
Mannitol	-	-	+	+
L-Arabinose	-	+	-	-
Glycogen	-	+	-	-
Melibiose	-	(+)	-	-
Rhamnose	d	-	-	d
Sucrose	(d)	+	-	-
Xylose	-	+	-	-

A la suite, de nombreux travaux, il est apparu que les limites taxonomiques, aussi bien à l'intérieur du genre Listeria qu'entre certaines familles de bactéries gram positif, non sporulées, n'étaient pas toujours évidentes. L'analyse numérique des caractères biochimiques ainsi que les études de la composition de l'ADN (% GC) et de l'hybridation ADN: ADN fournissent des renseignements intéressants, dont voici, brièvement, l'essentiel:

1) Les genres Listeria et Erysipelothrix ainsi que Microbacterium thermosphactum présentent beaucoup plus de similitudes avec la famille de Lactobacillaceae qu'avec certains membres de la famille de Corynebacteriaceae (par exemple, avec Arthrobacter) (17).

2) Listeria et Erysipelothrix ne sont pas des genres proches. Listeria semble être plus proche de Streptococcus faecalis tandis que Erysipelothrix est plus proche des autres streptocoques (80).

3) A l'intérieur du genre Listeria, les espèces L. murrayi et L. grayi sont pratiquement inséparables avec la technique de l'analyse numérique et elles forment un groupe génétiquement homogène, qui se distingue de L. monocytogenes (80,81).

4) Par ses caractères biochimiques et le ratio guanine + cytosine (% GC), L. denitrificans est très différente des autres espèces de Listeria (Tableau 1) et sa reclassification doit être envisagée (76,80,81).

Au vu de ces études une proposition a été formulée (82): que L. grayi et L. murrayi soient transférées dans un nouveau genre, Murraya, comme M. grayi et M. grayi subsp. murrayi et qu'une nouvelle famille, Listeriaceae, soit créée pour contenir les genres Listeria et Murraya. Mais les discussions sur ce point s'allongent. La taxonomie est un art délicat. La conviction que les catégories au-dessus du rang des espèces et, éventuellement, des genres, sont artificielles, gagne du terrain parmi les bactériologues. Ainsi, la création d'une famille de Listeriaceae devient plutôt une question d'opinion (38). Même si on accepte la proposition de la création de cette nouvelle famille, le problème n'est pas résolu pour autant. Une série des questions demeure sans réponses. Par exemple, quelle doit être la position taxonomique de certaines bactéries gram positif, non sporulées, relativement proches de L. monocytogenes comme Microbacterium thermosphactum et Erysipelothrix? Sur quels critères la différenciation des familles Listeriaceae et Lactobacillaceae doit-elle se faire? Est-ce que la différence morphologique seule suffit pour que les streptocoques soient séparés des lactobacilles dont ils sont si proches par ailleurs? Autant de questions qui laissent prévoir que l'arrangement taxonomique de cette gamme des bactéries

ne pourra pas s'effectuer avant qu'un supplément considérable d'information soit obtenu.

Quoi qu'il en soit, dans la dernière édition (8ème) de "Bergey's Manual" (76), le genre Listeria ainsi que les genres Erysipelothrix et Caryophanon furent placés comme "genres à affiliation incertaine", dans une section qui contient également les lactobacilles.

1.1b. Morphologie

L. monocytogenes est un bacille gram positif non sporulé. Il s'agit, généralement, de bacilles courts, voir cocoides, surtout dans les cultures jeunes. Sa taille est de 1 à 2 sur 0,5 et il a les extrémités arrondies. Il n'est pas capsulé mais il est probable qu'il existe une couche superficielle protéinique ou polypeptidique (10). La disposition des bactéries, en frottis sur lame, est variable: on trouve souvent des paires, parfois disposées en V, ou de courtes chaînes. Cette disposition, ainsi que sa morphologie, peuvent évoquer des bactéries du genre Corynebacterium, tandis que sa forme cocoide risque d'être confondue avec des streptocoques (24).

Dans les cultures âgées (3-4 jours), des formes longues ou même filamenteuses peuvent apparaître. Ces formes filamenteuses sont prédominantes dans le cas des souches rugueuses (R) (24,72).

L. monocytogenes possède une flagellation péritriche. La bactérie est peu ou pas mobile à 37°C mais toujours mobile lorsqu' on cultive à 20-22°C. Cependant, on a relaté récemment, l'existence de souches immobiles (36). Ces souches appartiennent au serovar 5 mais leur activité biochimique est plus faible que celle du serovar 5 mobile. En outre, elles donnent un test d'Anton (inoculation sur la conjonctive du lapin, entraînant une conjonctivite purulente) négatif et elles ne sont pas pathogènes pour la souris blanche, le cochon d'Inde et le lapin.

Des études au microscope électronique (20,41,60) ont révélé que la structure intracellulaire de L. monocytogenes est organisée d'une

manière très complexe. La membrane cytoplasmique semble former un tout avec un système de membranes intracytoplasmiques qui s'étendent jusqu'à l'intérieur de la région "nucléaire". Ces membranes peuvent être des simples invaginations, des structures en forme de spirale ou des "organelles" complexes, d'apparence variable. Le "noyau" contient des fibrilles, d'un diamètre d'environ 25-50 Å, dont l'orientation semble se modifier avec l'âge de la bactérie.

1.1c. Culture

Malgré le fait que l'isolement primaire de L. monocytogenes peut s'avérer difficile, la bactérie croît, par la suite, facilement sur les milieux usuels avec une préférence pour les milieux au tryptose (10). Les conditions optimales de sa croissance sont: pH 7,0 et température 30°C. Mais sa culture est possible entre 5,6 et 9,6 de pH et entre 3 et 45°C de température (24,44).

Dans les milieux liquides, L. monocytogenes produit un léger trouble après 18 à 24 h d'incubation La croissance dépend de la quantité et l'âge de l'inoculum. Des très petits inocula risquent, parfois, de ne pas pousser (24). Ceci pourrait expliquer certains échecs d'isoler L. monocytogenes à partir du matériel contenant un nombre réduit de bactéries viables. Après la fin de la phase exponentielle de croissance, les cultures liquides montrent une tendance à l'autolyse, ce qui est dû à la dégradation de la paroi des bactéries (85).

Sur les milieux solides, L. monocytogenes forme de petites colonies, rondes, lisses et translucides (10). Les colonies sur gélose transparente, observées à la loupe binoculaire, suivant la technique de Henry (32), de la transillumination oblique, comme elle était modifiée par Gray (23), présentent une coloration bleu-vert qui est suffisamment caractéristique (10,24,72).

Sur gélose au sang, une hémolyse de type β se développe. Elle est due à une hémolysine filtrante, qui provoque la lyse de la plupart

des globules rouges de mammifères. Cette hémolyse, qui peut s'atténuer ou disparaître lors des repiquages d'une souche (10), a toujours été considérée comme un caractère constant pour l'espèce. Mais, récemment, des souches de L. monocytogenes totalement dépourvues de propriété hémolytique ont été isolées de coprocultures humaines. Ces souches appartiennent toutes aux serovars 4f et 4g (6).

Dissociation coloniale: Les souches de L. monocytogenes ont une tendance de former différents types de colonies. Une vingtaine de types coloniaux ont été décrits (26), dont trois principaux: lisse (S), intermédiaire et rugueux (R). Les colonies S sont rondes, opaques; leur surface est brillante; leurs bords réguliers et elles se dispersent facilement dans une solution saline physiologique. Au contraire, les colonies R ont une surface mate et ridée; elles sont plus transparentes; leurs bords sont irréguliers et elles sont autoagglutinantes en suspension saline. Les formes des bactéries, qui prédominent dans les colonies R, sont des formes longues (6-20 µ) ou, parfois, filamenteuses (jusqu'à 275 µ). En outre, la production d'hémolysine ainsi que leur pouvoir pathogène, sont atténués ou nuls. Enfin, cette dissociation coloniale n'est pas réversible (72).

1.1d. Caractères biochimiques

L. monocytogenes est un germe aérobie mais facultativement anaérobie. Sa croissance est favorisée par une tension d'oxygène réduite (bactérie micro-aérophile).

Cette bactérie possède une catalase et une β-galactosidase. Elle fermente rapidement, sans production de gaz, le glucose, le tréhalose, l'amygdaline, la salicine et l'esculine. Elle fermente lentement le maltose et le sucrose. Elle tolère 6,5 p.100 de NaCl et 10 à 40 p.100 de bile et elle acidifie lentement le lait sans le coaguler. La recherche d'acétylméthylcarbinol est positive.

Ne sont pas métabolisés: le mannitol, l'arabinose, le raffinose, le dulcitol, le mélibiose, le glycérol et l'adonitol. La gélatine et le sérum coagulé ne sont pas liquéfiés; les nitrates ne sont pas réduits; il n'y a pas de production de H_2S ni d'indole; on n'a pas pu mettre en évidence les fonctions suivantes: coagulase, oxydase, phénylalanine désaminase, uréase, arginine dihydrolase, décarboxylase de l'ornithine, de la lysine, de l'arginine. Enfin, le citrate et le malonate ne sont pas utilisés (10, 24, 72).

Les espèces Listeria grayi, fermentant le mannitol, et Listeria murrayi, fermentant le mannitol et réduisant les nitrates, sont déjà mentionnées (76, 90).

L. monocytogenes possède un cycle de Krebs incomplet qui se compose d'une partie oxydative (citrate synthétase, aconitate hydratase et isocitrate déshydrogenase) et une partie réductrice (malate déshydrogenase, fumarate hydratase et fumarate réductase) (84).

1.1e. Composition chimique

Une étude (79) de la couche de peptidoglycan (synonymes: mureine, mucopeptide, glycopeptide, glycosaminopeptide, mucocomplexe de Park) de la paroi de L. monocytogenes a montré que cette couche constitue 0.4% du poids sec des cellules végétatives intactes. L'examen au microscope électronique révèle qu'il s'agit d'un matériel mince, délicat et presque transparent. L'analyse chimique quantitative indique que 27% du poids sec de ce peptidoglycan est constitué d'hydrates de carbone et 66% de peptides. Par contre, on n'a pas pu mettre en évidence d'acides teichoiques. En ce qui concerne le contenu des acides et des sucres aminés, l'hydrolyse de 0.75 mg de peptidoglycan de L. monocytogenes a donné les résultats suivants: acide diaminopimélique 12.93 µg, acide muramique 12.32 µg, glucosamine 564.75 µg, acide glutamique 22.66 µg, alanine 13.19 µg, acide aspartique 9.05 µg, leu-

cine 7.87 µg, isoleucine 6.57 µg, lysine 5.85 µg, histidine 1.55 µg, arginine 1.39 µg, threonine 4.76 µg, serine 3.78 µg, proline 3.91 µg, glycine 4.50 µg, valine 5.39 µg, méthionine 1.79 µg, tyrosine 4.71 µg, phénylalanine 3.30 µg. Il est intêressant de constater que le contenu d'acide glutamique est presque le double du contenu d'acide diaminopimélique, d'acide muramique ou de l'alanine. Il s'agit, là, d'un fait exceptionnel sinon unique, dont on ne connaît pas encore la signification.

1.1f. Structure antigénique

L'évolution des schémas antigéniques de L. monocytogenes, relatée dans différentes monographies (10,24,72), illustre assez bien l'évolution de nos connaissances sur cette bactérie. Ainsi, en 1939, Julianelle et Pons font un premier essai de classification, en distinguant deux types de Listeria: le type I, souche des rongeurs, et le type II, souche des ruminants. Ils affirmaient qu'on peut déterminer l'ultime origine des souches isolées d'un matériel infecté avec des méthodes sérologiques. Mais, une année plus tard, en 1940, Paterson, en utilisant des méthodes modernes d'analyse des antigènes somatiques et flagellaires, vient démontrer l'inexactitude de ce postulat. Le sérotype n'est d'aucune manière en relation, ni avec l'hôte, ni avec la forme de la maladie. Il a décrit 4 sérotypes en fonction des antigènes somatiques (O) et flagellaires (H). Les sérotypes 1,3 et 4 diffèrent par leur antigène O, tandis que le sérotype 2 se distingue du sérotype 1 par un facteur H spécifique.

Seeliger, en 1958, sur la base des antigènes O, divise le sérotype 4 en 4a et 4b.

Donker-Voet, en 1959, divise encore plus ce groupe en 4c, 4d et 4e, toujours sur la base des antigènes somatiques. Elle trouve également quelques différences aux antigènes flagellaires de certaines souches du sérotype 1 et 3 et elle désigne ces souches comme la et 3a.

Tableau 2: Serovars de L. monocytogenes et leurs relations avec L. grayi et L. murrayi (73)

Désignation		Antigènes O															Ag H
Paterson	Seeliger-Donker-Voet																
1	1/2a	I	II	(III)													AB
	1/2b	I	II	(III)													ABC
2	1/2c	I	II	(III)													B D
3	3a		II	(III)	IV												AB
	3b		II	(III)	IV												ABC
	3c		II	(III)	IV												B D
4	4a			(III)		(V)		VII		IX							ABC
	4ab			(III)		V	VI	VII		IX							ABC
	4b			(III)		V	VI										ABC
	4c			(III)		V		VII									ABC
	4d			(III)		(V)	VI		VIII								ABC
	4e			(III)		V	VI		(VIII)	(IX)							ABC
	4f			(III)		V										XV	ABC
	4g			(III)		V	VI	VII			X	XI					ABC
	5			(III)		(V)	VI		VIII		X						ABC
	6			(III)				VII	VIII			XI					ABC
	7			(III)									XII	XIII			ABC
	L. grayi			(III)									(XII)		XIV		E...
	L. murrayi			(III)									(XII)		XIV		E...

La classification actuelle est donnée dans le tableau 2 emprunté à Seeliger (73). Hormis les serovars qui figurent sur ce tableau, d'autres combinaisons d'antigènes existent (73) mais leur nature doit encore être étudiée.

Les souches isolées chez l'homme sont, en général, du type 1 en Scandinavie et dans les pays de l'Europe de l'Est, alors qu'aux U.S.A. et en Europe occidentale, le type 4b prédomine: 65% aux U.S.A. (43) et 75% en France (10).

1.1g. Formes L

La difficulté d'isoler L. monocytogenes à partir de tissus animaux, artificiellement ou naturellement infectés, a souvent suggéré l'existence possible de formes L (45). La coloration de ces mêmes tissus révèle la présence intracellulaire de petites formes granulaires. Ces formes, quand elles ne sont pas écartées comme des artefacts, rappellent également les formes L (24). Mais leur incidence et leur rôle, dans le contexte de la listériose, sont encore très mal connus (66).

Cependant, Pease, en 1967, se basant sur les faits suivants: 1) Listeria est une bactérie très largement diffusée dans la nature tandis que la listériose est relativement rare, 2) il y a des indications que l'état de porteur est beaucoup plus répandu que la manifestation de la maladie le laisserait croire, 3) l'ADN de Listeria a un contenu G + C assez proche de celui de l'homme ($\simeq$ 40%), 4) Listeria possède l'antigène I (antigène sanguin), 5) Listeria possède également des antigènes très proches de ceux des streptocoques, 6) on isole, souvent, chez les malades souffrant d'une maladie auto-immune ou néoplasique, des Listeria ou des "pseudodiphtériques", a formulé l'hypothèse siuvante: Listeria semble être un agent infectieux universel. Contracté, soit pendant la vie intra-utérine, soit tout de suite après la naissance, sous sa forme dépourvue de parois, donc sous sa forme la moins antigénique, la bactérie est très bien tolérée et elle peut parasiter l'organisme de façon chronique, soit en tant que forme L, soit en tant qu'épisome.

La perturbation de cette tolérance immunitaire, peut être à l'origine, soit d'une maladie auto-immune, soit d'un cancer. Une diminution de la tolérance pourrait aboutir à la manifestation d'une maladie rhumatoide; une augmentation de la tolérance pourrait donner naissance à un cancer. Compte-tenu du fait que Listeria possède l'antigène I et qu'au cours de certains cancers on trouve l'antigène embryonnaire i, Pease suggère le mécanisme suivant: une augmentation de la tolerance aboutirait à un excès d'antigène adulte I, ce qui pourrait déclencher une tendance à la suppression de I et à la sélection de l'antigène embryonnaire i. Finalement, l'augmentation de la tolérance permettrait l'apparition de formes normales (avec paroi) de Listeria, ce qui pourrait expliquer leur isolement relativement fréquent à partir de lésions néoplasiques.

Expérimentalement les formes L de Listeria ont pu être obtenues par induction sur des milieux semi-solides hypertoniques (4% NaCl ou KCl) avec la méthode de gradients de pénicilline (19). Les formes L ainsi obtenues, après 2-3 repiquages sur milieux avec pénicilline sont devenues stables et elles ont pu se cultiver sur milieux dépourvus de pénicilline sans qu'il y ait une réversion spontanée. Leurs réactions de fermentation ont été identiques à celles des souches parentales.

En milieu semi-solide les colonies ont eu l'apparence typique des "oeufs au plat" tandis qu'en milieu liquide la croissance a été beaucoup plus lente et elles sont apparues comme des agglomérats au fond des tubes.

1.1h. Phages

L'existence de bactériophages spécifiques pour L. monocytogenes a été signalée dès 1945 (E.W. Schultz). Par induction, à l'aide des U.V., on a pu obtenir, à partir de souches lysogènes, quelques 16 phages dont 9 semblent être utilisables à des fins de typage. On obtient ainsi des groupes qui correspondent presque exactement aux sérotypes de Paterson. L'avantage de la méthode semble être l'absence de réactions

croisées avec d'autres bactéries (Streptocoques, Staphylocoques) comme c'est le cas avec la typisation sérologique (22,24). En tout cas, la méthode doit être étudiée, affinée et standardisée avant de pouvoir être utilisée routinièrement.

Du point de vue morphologique, les phages de Listeria (listériphages) sont semblables sinon identiques. Ils ont une tête en forme d'icosaèdre d'un diamètre d'environ 60 nm et une queue d'une longueur moyenne de 260 nm.

On ne connaît pas encore très bien les modalités de la distribution des listériphages et leur importance épidémiologique. Une étude portant sur 96 souches de Listeria a montré, que 35% de ces souches étaient lysogènes (13). En outre, les listéria du type 3 semblent être relativement résistantes aux phages (24).

1.2. Pathogénie

Le pouvoir pathogène de L. monocytogenes est difficile à cerner. Ceci est dû, principalement, aux raisons suivantes:

1) la variabilité des manifestations cliniques de la listériose (Tableau 3), qui peuvent être très différentes, aussi bien au sein de la même espèce qu'entre espèces différentes,
2) la difficulté d'isoler la bactérie à partir de produits "pathologiques",
3) la méconnaissance de l'étendue de la diffusion ainsi que de ses voies le distribution dans la nature.

En outre, la listériose n'est pas toujours conforme à la définition classique de l'infection et les postulats de Koch ne peuvent pas toujours être satisfaits (7, 24, 66). De ce fait, aucun symptôme n'est pathognomonique de la maladie et son diagnostic repose entièrement sur la bactériologie.

Pour la meilleure compréhension de la pathogénie de la listériose, trois aspects nous paraissent importants: a) la capacité de survie et de multiplication de L. monocytogenes dans l'organisme, b) la production de substances toxiques, c) le rôle du "terrain" dans lequel la maladie se manifeste.

a) Survie et multiplication dans l'organisme. La bactérie est généralement bien tolérée par l'organisme et elle peut facilement se multiplier à l'intérieur des cellules (12). De ce fait, elle peut être considérée comme un parasite intra-cellulaire facultatif. Pourtant, il semble que le moyen de survie de la bactérie à l'intérieur de l'organisme n'est pas tellement sa forme bactérienne normale, mais, plutôt, sa forme L. Effectivement, on a souvent attiré l'attention (7, 19) sur le rôle de ces formes, dépourvues de paroi, qui, étant moins antigéniques, n'éveillent pas les mécanismes de défense et qui peuvent "parasiter" longtemps l'organisme. Elles sont, ainsi, à l'origine d'infections latentes ou inapparentes, à partir desquelles la maladie peut se développer. Quels sont les facteurs qui peuvent interrompre cet état

Tableau 3: Désordres avec lesquels Listeria monocytogenes peut être associée (24)

1) Méningo-encéphalite (surtout des nouveau-nés)
2) Septicémie inapparente avec terminaisons prématurées ou non viables
3) Septicémie périnatale (surtout des prématurés)
4) Syndrome ressemblant à la mononucléose infectieuse
5) Septicémie chez l'adulte (souvent superposée à d'autres symptômes: otite, pharyngite, sinusite, etc.)
6) Pneumonie
7) Endocardite
8) Abcès localisés (internes ou externes)
9) Conjonctivite
10) Lésions cutanées (papules, nodules, etc.)
11) Uréthrite
12) Avortements à répétition
13) Troubles mentaux, psychose (évidence sérologique seulement)

de latence et provoquer la manifestation de la maladie? Nous les connaissons encore très mal. Toutefois, il semble que, en dehors des conditions qui favorisent toutes les infections (i.e. stress, âge, etc.), il existe des facteurs qui favorisent spécialement la croissance de L. monocytogenes. Par exemple, on a prouvé, expérimentalement, que l'augmentation du niveau de fer provoque, in vivo, une réduction, de l'LD_{50} (83). Les souris deviennent plus sensibles à l'infection avec L. monocytogenes, après injection de fer (Fe^{+++} ou Fe^{++}). Ce traitement n'influence aucunement le système réticuloendothélial, mais il agit directement sur la croissance bactérienne. Ceci a été confirmé par des expé-

riences in vitro. Les animaux, chez lesquels on a provoqué une anémie hémolytique expérimentale, deviennent, également, plus sensibles à la listériose. Par contre, les animaux traités au Desferal – un agent chélateur du fer – semblent devenir plus résistants.

Dans les cas graves de listériose, l'implication du système nerveux central est caractéristique. Elle se manifeste sous forme de méningite ou de méningo-encéphalite. On s'est longtemps posé la question de savoir quelle voie la bactérie emprunte pour atteindre le liquide rachidien. Le problème n'est pas encore entièrement élucidé. Il semblerait que le système nerveux central est atteint par l'intermédiaire de l'enveloppe des nerfs et non pas par voie sanguine. Des animaux (chèvres, lapins, souris), contaminés expérimentalement (4) par instillation oculaire de L. monocytogenes ou par inoculation au moyen de minuscules lésions des muqueuses nasales ou de la lèvre supérieure, ont développé une encéphalite listérique typique, avec salivation abondante, mouvement circulaire, torticolis, paralysie des muscles masséters, incoordination des extrémités et, finalement, coma. L'autopsie a révélé des lésions tout le long des branches et de la racine du nerf trijumeau et du bulbe rachidien. L'image histologique de ces lésions était identique à celle de l'encéphalite listérique "naturelle". Les mêmes résultats ont été obtenus en nourrissant les animaux avec des aliments préalablement stérilisés et imbibés d'une suspension de L. monocytogenes. Par contre, l'injection directe de la bactérie dans le sang n'a pas provoqué d'encéphalite.

Dans la listériose génitale de la femme enceinte, l'utérus est atteint par voie sanguine et le foetus par voie transplacentaire. Dans certains cas, le nouveau-né peut se contaminer par les sécrétions vaginales, lors de son expulsion (10). L'infection ascendante de l'utérus, à partir d'une vaginite listérique, a été également demontrée (58).

Quelles sont les conséquences de la prolifération et de la dissémination de L. monocytogenes dans l'organisme? Des données, principalement expérimentales, indiquent qu'il en résulte un grave déséquilibre du métabolisme de l'hôte (92, 93). Des souris blanches, inoculées, manifestent un dérangement profond du métabolisme hépatique des purines et des

hydrates de carbone. L'activité de l'uricase ainsi que la phosphorylation oxydative diminuent à mesure que la sévérité de l'infection progresse. Par contre, l'activité de la xanthine déshydrogénase et le niveau de l'acide urique sanguin augmentent constamment jusqu'à la mort de l'animal. Mais, l'effet le plus spectaculaire de l'infection listérique est la diminution critique du glucose et du glycogène, diminution due à une baisse de l'activité de l'uridine-diphosphate glucose-glycogène transglucosylase du foie. Enfin, l'augmentation du niveau de pyruvate et de lactate dans le sang reflète bien l'étendue de la distorsion que le métabolisme des hydrates de carbone subit.

b) Production de substances toxiques. Les substances produites par L. monocytogenes, ayant un effet toxique sur l'organisme infecté peuvent, schématiquement, se diviser en deux groupes: I. Substances toxiques extracellulaires II. Substances toxiques faisant partie de la cellule bactérienne.

I. Substances toxiques extracellulaires. Il s'agit, généralement, de substances solubles et filtrantes qui ont une activité hémolytique et lipolytique (24, 37).

Leur activité hémolytique est dirigée contre les globules rouges de la plupart des mammifères et elle a été longtemps considérée comme caractéristique pour l'espèce L. monocytogenes. Mais cette propriété peut diminuer, ou disparaître lors des repiquages et, en outre, on a isolé, récemment, des souches totalement dépourvues d'hémolysines.

L'activité lipolytique est propre aux souches virulentes de L. monocytogenes. Les souches non virulentes et la plupart des souches non hémolytiques montrent une activité réduite ou nulle. L'acitivté lipolytique persiste, après chauffage à 60^{o} et à 80^{o}C pendant 30 minutes, quand on utilise, comme substrat, le plasma humain; mais elle est diminuée ou absente quand on utilise d'autres substrats comme L-tripropionine, tributyrine, triacétine ou un extrait lipidique cérébral (37).

Ces hémolysines sont également douées, in vitro, d'un pouvoir cytotoxique sur les macrophages de la souris (86).

Une autre toxine extracellulaire a été mise en évidence dans le filtrat des cultures de L. monocytogenes (49). Cette toxine provoquait, chez le lapin, des lésions hémorragiques locales 3 heures après inoculation intracutanée. Après 18 heures, ces lésions se transformaient en nécroses, identiques à celles provoquées par une culture vivante de L. monocytogenes. Enfin, ce même filtrat tuait la souris 24 à 48 heures après inoculation intrapéritonéale.

II. Substances toxiques de la cellule bactérienne. Il s'agit de substances qui font partie de la cellule de L. monocytogenes et qui ne sont libérées qu'après la lyse de celle-ci. Dans cette perspective, on peut, donc les considérer comme des endotoxines.

Le facteur responsable de la monocytose (MPA: "monocytosis-producing agent" de Stanley) a fait l'objet de nombreuses recherches. Son action sur les monocytes du sang, (augmentation du taux normal d'environ 6.000 fois) sans augmentation notable du nombre des autres leucocytes (24), a tout de suite éveillé l'intérêt des histologistes, qui ont vu, dans cette propriété, un formidable outil pour l'étude des origines et du développement des monocytes.

Cette monocytose ne semble pas être déterminée uniquement par la bactérie. La nature de l'hôte joue, également, un rôle important quant à la manifestation du phénomène. Ainsi, en listériose humaine, l'augmentation des monocytes reste exceptionnelle tandis que, en listériose animale, elle est constante chez les animaux monogastriques alors qu'elle n'est pratiquement jamais retrouvée chez les ruminants (24).

Du point de vue chimique, MPA est un phospholipide qui semble se situer au niveau de la membrane cytoplasmique (33). Son activité de l'induction de la monocytose paraît être liée à la fraction monoglycéride. L'analyse chimique révèle que, en dehors de la partie lipidique, les extraits de MPA contiennent 0.97 à 5.0% d'hydrates de carbone, 1.37 à 1.49% de protéines et 0.38 à 0.58% d'azote. Cinq composants lipidiques, au moins, peuvent être séparés par chromatographie en couche mince. Les classes des lipides contenues dans les dits extraits sont: glycérides, glycolipides et phosphatidyl-choline.

Le MPA semble affecter le métabolisme des stéroïdes et déranger, ainsi, les mécanismes homéostatiques de l'organisme. Mais son rôle dans la pathogénie de la listériose demeure encore obscur.

D'autres substances toxiques ont pu être isolées de la paroi de L. monocytogenes. Une fraction d'un polysaccharide, testée sur des lapins, provoquait des réactions cutanées (69). Une fraction protéinique provoquait des modifications du tracé de l'ECG, notamment une augmentation du T et une distorsion du complexe QRS, également chez les lapins. En outre, les animaux présentaient une accélération de la respiration, une augmentation de la température et une hyperglycémie suivie par une hypoglycémie (56).

c) Rôle du "terrain". Le fait que la listériose se manifeste dans certaines conditions ou au cours de certains états pathologiques, avec une fréquence non négligeable, suggère que le rôle du "terrain" est déterminant.

La fréquence, relativement élevée, de la listériose de la femme enceinte, pourrait n'être qu'apparente, la grossesse n'étant qu'une cause révélatrice d'une infection latente et non pas une cause favorisante (12).

Par contre, il semble exister une corrélation entre la listériose et certains états pathologiques tels que les maladies virales, les processus néoplasiques, la tuberculose, les cirrhoses, les maladies auto-immunes, le diabète, l'éthylisme ou certaines thérapeutiques comme l'administration d'immunodépresseurs et d'antimétabolites, la radiothérapie etc. (10, 12, 24, 50, 67).

Dans une statistique (43) portant sur 731 cas de listériose humaine diagnostiqués aux Etats-Unis de 1933 à 1966, on trouve 11 cas de diabète, 20 cas d'alcoolisme et 51 cas de maladies néoplasiques.

Ici, il nous semble utile de rappeler deux hypothèses, dont la confirmation ou l'infirmation dans l'avenir, contribuera grandement à la meilleure compréhension des maladies infectieuses, en général, et de la listériose, en particulier: 1) L. monocytogenes serait une bac-

térie ubiquitaire, peut-être un saprophyte du sol et de l'intestin des animaux et de l'homme; dans cette circonstance, la listériose latente ou inapparente serait beaucoup plus répandue que le nombre des cas "cliniques" le laisse prévoir. Dans ce contexte, tous les facteurs ou les situations, qui diminuent ou altèrent les mécanismes de défense de l'organisme, pourraient mettre en évidence l'infection sous-jacente et favoriser la manifestation de la maladie. 2) Les formes L de L. monocytogenes pourraient jouer le rôle d'un "médiateur" infectieux pour certaines maladies auto-immunes ou certaines formes de cancer. Dans ce cas, l'infection listérique ne serait pas une complication secondaire mais, de nouveau, une situation préexistante. Chacune de ces deux hypothèses s'appuie, actuellement, sur un nombre croissant d'indications. Mais la preuve formelle n'a pas encore pu être obtenue.

1.2a. Listériose des animaux

La maladie est très répandue dans le règne animal et on a longtemps considéré que ce dernier constitue le réservoir principal des germes. Aujourd'hui, on se pose la question de savoir si les animaux sont contaminés par le sol ou si, au contraire, ils sont responsables de la contamination du sol.

En tout cas, la listériose a été reconnue chez une large gamme d'animaux domestiques ou sauvages, qui comprend des mammifères (ruminants, porcins, équidés, félins, rongeurs ...), des oiseaux, des reptiles et des poissons. De tous les mammifères, les ovins semblent être les plus fréquemment atteints (10).

Les manifestations de la maladie sont si variées, que le terme "listériose" ne peut pas avoir une signification précise; c'est pourquoi, on a proposé de remplacer le dit terme et d'employer le terme d' "infection listérique", qui modifie la spécificité du processus de la maladie (24). Malgré cette variété, il semble que l'hôte soit déterminant

pour la manifestation de tel ou tel aspect de l'infection. Ainsi, chez les ruminants, le symptôme dominant est l'encéphalite ou la méningo-encéphalite localisée, chez les animaux monogastriques ou les jeunes ruminants (avant que le rumen ait commencé à fonctionner), la septicémie avec une nécrose hépatique, plus ou moins importante, mais sans implication notable du système nerveux central et, chez les volailles, la septicémie avec dégénérescence du myocarde (14).

L'avortement et les infections périnatales semblent concerner tous les mammifères.

1.2b. Listériose de l'homme

Les tableaux très divers que la listériose humaine peut donner ont été à l'origine de plusieurs essais de classification de la maladie. Ainsi, on est arrivé à individualiser des formes très rares ou des formes qui reflétaient la méconnaissance de l'infection listérique.

Actuellement, on tend à considérer quatre formes principales qui correspondent mieux aux réalités cliniques: formes nerveuses, formes septicémiques, formes localisées et formes atténuées ou inapparentes (45).

La distinction classique de la listériose du nouveau-né et de la listériose de l'enfant et de l'adulte nous paraît plutôt artificielle.

La listériose de la femme enceinte, quoiqu'elle ne puisse être considérée comme une entité clinique particulière, est, souvent, étudiée séparément à cause des graves répercussions qu'elle peut avoir sur le foetus. Mais, comme nous l'avons déjà signalé, la grossesse ne doit pas être considérée comme un facteur favorisant la maladie. Elle est plutôt un révélateur d'une infection préexistante.

Mentionnons, enfin, une forme de la maladie propre au nouveau-né: la listériose nodulaire disséminée ("granulomatosis infantiseptica" des auteurs allemands).

De tous les aspects de la maladie, la listériose néo - natale et, chez l'adulte, les manifestations méningo-encéphalitiques dominent de loin (10). Une étude concernant les cas de listériose humaine en Louisiane, pour la période 1954 à 1974, révèle que la forme granulomateuse septique du nouveau-né est la forme la plus meurtrière, (100% de mortalité) suivie par la listériose du système nerveux central chez l'adulte (70.5% de mortalité) (34).

D'une manière générale, le nouveau-né et l'adulte âgé de plus de 50 ans sont les plus fréquemment atteints par la listériose. Une statistique, qui porte sur 400 cas publiés en France, montre que plus de la moitié des cas concerne les nouveau-nés, un peu moins d'un quart, les adultes âgés de 18 à 50 ans et, un quart, les adultes au-delà de 50 ans. Entre 1 mois et 18 ans, la listériose semble être plus rare (environ 3%) (10).

Une statistique américaine (43) présente des résultats légèrement différents: nouveau-nés: 39%, enfants et adolescents (de 1 mois à 17 ans): 16%, adultes de 18 à 50 ans: 18%, au-delà de 50 ans: 26%.

1.3. Epidémiologie

Comme pour la pathogénie, le tableau de l'épidémiologie de L. monocytogenes est couvert de larges plages obscures au milieu desquelles les quelques morceaux du puzzle que les bactériologistes et les cliniciens ont pu mettre en place semblent peu de choses.

Lorsque nous étudions ce tableau, nous constatons, en principe, que deux points retiennent l'attention: a) malgré la large distribution de la bactérie (on l'a trouvée pratiquement partout où on l'a cherchée), la maladie reste relativement rare. Elle évolue, plutôt, de façon sporadique au sein d'une collectivité humaine ou animale alors que les véritables épidémies sont exceptionnelles. b) A part la transmission materno-foetale, qui est assez bien connue, il est pratiquement impossible de démontrer un mode de transmission indiquant, d'une manière satisfaisante, les voies de contamination. La bactérie se comporte le plus souvent comme un saprophyte et son pouvoir pathogène semble avoir besoin de certains facteurs "favorables" pour se manifester (67). Quant à la nature de ces facteurs, on en est, généralement, réduit aux hypothèses.

Nous allons essayer de cerner trois points épidémiologiques importants: I, la fréquence de la maladie, II, la distribution géographique de la bactérie, III, les sources possibles de contamination.

I. Fréquence de la maladie. L'étude des statistiques, portant sur les cas de listériose et provenant de différents pays, donne l'impression que le nombre de ces cas est en augmentation constante. Mais il est très difficile d'établir, dans quelle mesure, cette augmentation est réelle ou si elle est due à une amélioration des méthodes de recherche de la bactérie et à une meilleure information.

En Allemagne, pendant la période qui va de 1950 à 1959, 500 cas de listériose humaine ont été, observés, tandis que, de 1960 à 1966, on a diagnostiqué quelque 1500 cas. Au Pays-Bas, pour 418 cas d'animaux et 57 cas humains observés de 1956 à 1960, il y avait 803 cas d'animaux et 230 cas humains de 1961 à 1963.

Aux Etats-Unis, l'augmentation est également frappante: 184 cas humains de 1933 à 1958 et 547 cas de 1959 à 1966.

En France, sur 400 cas publiés jusqu'en 1972, plus de la moitié ont été signalés depuis 1965 (10).

Mais ces chiffres, concernant des cas bactériologiquement reconnus, ne donnent qu'une vue partielle de l'étendue de l'infection. Il faut y ajouter le nombre des "porteurs sains" qui varie, suivant les pays et les auteurs, entre 4,7% (6) et 34% (40) des groupes examinés. Mais ces pourcentages sont, de nouveau, établis au moyen de preuves bactériologiques. Or, même dans les produits pathologiques, le nombre des bactéries viables peut être très petit (8). Ce fait suggère que, faute de croissance de L. monocytogenes, de nombreux cas passent inaperçus.

II. Distribution géographique. Parallèlement à l'augmentation, du moins apparente, des cas de listériose, on remarque une extension géographique de la maladie (10). Chaque année, elle est signalée dans des pays dans lesquels on ne l'avait jamais trouvée jusqu'alors. Mais on a, généralement, l'impression que sa distribution est beaucoup plus large dans les zones tempérées que dans les zones chaudes du globe. Il est très difficile de dire dans quelle mesure cette impression est justifiée et s'il ne s'agit pas d'un artefact, dû à des différences au niveau des méthodes d'investigation.

III. Sources de contamination. On a longtemps considéré les animaux sauvages, et domestiques, comme la principale source de contamination de l'homme. En effet, la plupart des espèces animales à sang chaud, sont susceptibles à l'infection listérique (87). Cependant, des études sur l'incidence de L. monocytogenes, concernant des femmes enceintes, avec ou sans contact animal (40), ainsi que des études concernant des populations rurales et urbaines (54), montrent une distribution homogène de la bactérie, ce qui signifie que l'infection directe par les animaux, sans qu'elle soit exclue, ne doit pas être importante.

Les produits d'origine animale (viande, lait, oeufs, etc.) ont été, également, soupçonnés de véhiculer la maladie, mais ceci n'a pas pu être formellement prouvé (45).

Actuellement, la présence diffuse de L. monocytogenes dans l'environnement est considérée comme le plus important facteur de la contamination des animaux et de l'homme (35). Plusieurs études semblent corroborer cette thèse. Par exemple, au cours d'une étude (88), en Allemagne de l'Ouest, qui a duré de 1972 à 1974, on a pu isoler 154 souches de L. monocytogenes, de sources aussi diverses que le sol, les plantes, les animaux en liberté et les oiseaux. Le nombre le plus élevé de souches a été obtenu dans les régions incultes. Une autre étude, menée dans les Pays-Bas donne, aussi, des renseignements intéressants. Durant 2 ans consécutifs, au printemps et en automne, on a collecté des échantillons dans 12 fermes et dans 7 domaines incultes. L. monocytogenes a été isolée dans 11 des 12 fermes et dans 6 des 7 régions incultes. Toutes les souches ont été obtenues au printemps alors que les prélèvements faits en automne ont tous été négatifs. Il semble que la végétation humide, en décomposition, favorise la croissance ou, du moins, la survie de L. monocytogenes. En septembre, aucun prélèvement positif n'a été obtenu sur des plantes vertes ou sur des plantes récemment desséchées, alors que, dans les régions susmentionnées, on a isolé la bactérie au printemps suivant. La sécheresse de la surface du sol peut aussi expliquer l'absence d'isolements parmi les échantillons collectés en automne. Le sol et les plantes sont-ils contaminés par les animaux ou, inversément, les animaux sont-ils contaminés par les plantes? Le fait, qu'on n'a pas trouvé d'Escherichia coli sur les lieux où on a isolé L' monocytogenes, semble indiquer qu'il n'y avait pas une contamination fécale notable. Mais l'élimination d'E. coli, bactérie moins résistante aux basses températures, peut aussi être envisagée. La question reste donc posée (89).

A la lumière de récentes enquêtes épidémiologiques, trois faits importants semblent se dégager (54):

1, l'environnement contaminé joue un rôle prépondérant comme source commune de contamination pour l'homme et les animaux.

2, la transmission de la maladie entre différentes espèces est plutôt exceptionnelle, ce qui ne cadre pas très bien avec la notion classique de la listériose considérée comme une anthropozoonose,

3, la fréquence de la listériose est comparable entre les populations urbaines et rurales.

Ces faits suggéraient une nouvelle conception épidémiologique et pathogénique, dans le cadre de laquelle, L. monocytogenes pourrait être considéré comme une bactérie ubiquitaire et la listériose comme une sapronose d'origine hydro-tellurique.

1.4. Immunologie

Les multiples aspects que la listériose peut revêtir (maladie grave à mortalité élevée, infection inapparente, infection latente) ont attiré l'attention sur la nature de la réponse immunitaire de l'hôte et les mécanismes qui déterminent cette réponse. Un nombre très élevé de travaux a été effectué à ce sujet. Il a été ainsi démontré que l'animal, après une primo-infection, acquiert une résistance contre L. monocytogenes. Cette résistance est due au développement d'une hypersensibilité retardée (HR), dont le transfert passif peut être effectué par les lymphocytes et non pas par le sérum. Il s'agit donc d'une réponse à médiation cellulaire (51). Elle apparaît quelques jours après l'infection et elle peut persister longtemps. Par exemple, chez le cochon d'Inde, elle atteint son maximum le 5ème ou 6ème jour "post-infectieux" et elle dure environ 41 semaines pour les femelles et environ 46 semaines pour les mâles (31).

Quels sont les mécanismes de cette immunité à médiation cellulaire? Elle a, d'abord, été attribuée aux cellules T (cellules thymo-dépendantes) et au macrophages (52). En effet, les cellules T des souris immunisées avec L. monocytogenes, peuvent activer, in vitro, les macrophages des souris non immunisées et favoriser la destruction des bactéries intracellulaires (15). Les cellules T n'agissent donc pas directement sur les bactéries mais elles stimulent les macrophages, qui semblent être les cellules "effectrices" (21). Les macrophages procèdent, principalement, par phagocytose et digestion des bactéries. Mais ils peuvent, également, produire des substances qui interviennent dans le processus de l'élimination de listéria (57, 77). Les caractéristiques de ces substances sont:

1) elles sont présentes dans les cultures des macrophages "activés", au bout de 17 heures et elles continuent d'être produites, même après lavages répétés des cultures, jusqu'à 72 heures.

2) Leur poids moléculaire est de 50 000 ou plus.

3) Elles sont stables à 56^{o}C, pendant 30 minutes, dans les milieux contenant du sérum.

4) Elles s'adsorbent sur les bactéries à O C.

5) Elles sont inactivées par des agents fortement réducteurs (dithiothreitol) et partiellement réactivées par oxydation avec du H_2O_2.

6) Elles sont solubles et filtrantes.

7) Elles sont inactives contre deux sérotypes de Salmonella (S. typhi et S. typhi-murium).

8) Leur action anti-listérique n'est pas influencée par la présence d'anticorps contre L. monocytogenes.

La bactérie provoque, également, une réaction de la part des cellules B (cellules thymo-indépendantes). On a démontré, récemment, qu'au moins une fraction de la paroi listérique agit directement sur les cellules B, favorisant leur division et la production d'anticorps sans que les cellules T soient impliquées ou influencées (11).

L'effet protecteur des lymphocytes immuns semble dépendre, in vitro, de deux paramètres: la dose des lymphocytes et la dose de l'agent infectieux. Il existe un seuil, pour chaque agent infectieux, au-delà duquel les lymphocytes ne sont plus effectifs (96).

Hormis les cellules T, les cellules B et les macrophages, d'autres cellules participent à la résistance contre L. monocytogenes. On a démontré, par exemple, in vitro, que les thrombocytes de lapin influencent le comportement des macrophages de la souris et ils augmentent leur pouvoir de détruire les bactéries phagocytées. Ce fait semble indiquer que le rôle des thrombocytes ne se limite pas seulement à l'hémostase mais qu'ils participent activement à la défense de l'organisme (91).

La résistance acquise, à médiation cellulaire, est une réaction immunitaire spécifique. L'élément antigénique qui déclenche cette réaction est, très probablement, la paroi de L. monocytogenes (70). Ceci renforce l'hypothèse de la sélection des formes bactériennes dépourvues de parois (formes L) comme moyen de parasitisme de l'organisme.

Il existe, également, une résistance non spécifique contre L. monocytogenes qui se développe par suite d'une infection avec d'autres micro-organismes comme mycobactéries (39), Trichinella spiralis (16),

Treponema pallidum (71). L. monocytogenes engendre une résistance non spécifique contre Candida albicans, tandis que l'inverse n'a pas pu être obtenu (53).

Une macromolécule chargée, le sulfate de dextran 500 (PM 500 000), diminue considérablement la résistance contre L. monocytogenes (29). Des souris traitées préalablement au sulfate de dextran 500 semblent incapables de manifester une défense contre la bactérie. L'effet de cette substance est de courte durée et ne dure guère plus de 2 à 3 jours. La cible primaire de son action sont les phagocytes mononucléaires (30).

Mentionons, enfin, la propriété de certains antibiotiques (i.e. ampicilline, tetracycline, chloramphénicol) d'augmenter, à des concentrations qui n'affectent pas directement les micro-organismes, le pouvoir des macrophages à phagocyter, in vitro, L. monocytogenes. Cette augmentation varie de 40 à 75% si on considère comme base (100%) la capacité des macrophages non traités. Les mêmes résultats ont été obtenus avec d'autres bactéries (i.e. E. coli). Le fait mérite d'être signalé, quoique le mécanisme de cette augmentation de la phagocytose reste à élucider (2).

1.5. Sérologie

De nombreuses méthodes immunologiques, proposées pour mettre en évidence la présence d'anticorps sériques contre L. monocytogenes, la séro-agglutination et la fixation du complément sont, de loin, les plus utilisées en pratique. L'évaluation des résultats ainsi obtenus a suscité beaucoup de travaux et presque autant de discussions. En effet, une certaine prudence s'impose pour l'interprétation de ces résultats, interprétation qui rend souvent délicate la tâche aussi bien du laboratoire que du clinicien. Plusieurs raisons sont à l'origine de ces difficultés. Un aspect qu'on a souvent tendance à oublier est l'influence de la qualité des antigènes utilisés. Seeliger et Finger insistent, à juste titre, sur ce point et ils donnent en détail la métode de leur préparation (74). Mais la difficulté principale est due à trois raisons: la présence diffuse d'anticorps sériques contre L. monocytogenes dans les populations humaines ou animales, le rapport, pas toujours évident, entre ces anticorps sériques et la listériose et, finalement, l'existence de communautés antigéniques entre L. monocytogenes et d'autres bactéries (staphylocoques et entérocoques en particulier).

Le sérum de la plupart des vertébrés (mammifères, oiseaux, poissons, reptiles) contient des agglutinines contre L. monocytogenes (62). Il en est de même pour le sérum humain. Il est très difficile de se faire une idée claire de la quantité et de la fréquence de ces agglutinines. Les travaux effectués à ce sujet aboutissent à des conclusions souvent contradictoires et les pourcentages avancés varient de 2,9% à 54,11% ou plus, pour une population donnée (74). Ces divergences sont, principalement, dues à l'absence de standardisation des techniques, à l'absence de saturation des sérums positifs par des antigènes de staphylocoques et d'entérocoques et l'hétérogénéité des échantillons de la population examinée (sujets sains, malades, professions différentes etc.) (10). En tout cas, la question reste posée de savoir si les taux d'agglutinines, répandus dans une population, sont dus à des réactions croisées avec d'autres bactéries gram positif, ou bien à des infections latentes ou inapparentes à L. monocytogenes (95).

Il n'existe pas toujours un rapport direct entre la présence des anitcorps sériques et la listériose. Des taux, de 1/160 jusqu'à 1/640 ou plus, ont été trouvés sans qu'il y ait un signe quelconque d'infection. Inversément, une absence d'agglutinines a pu être constatée à plusieurs reprises chez des malades souffrant d'une listériose bactériologiquement prouvée (74). Ces faits contribuent à l'incertitude concernant la valeur de la recherche des anticorps sériques pour le diagnostic ou le dépistage d'une infection listérique.

Les communautés antigéniques avec d'autres germes portent essentiellement sur les antigènes O et elles compliquent, également, l'interprétation des résultats sérologiques. On a souvent attribué ces réactions croisées à l'antigène de Rantz, antigène commun à certaines bactéries gram positif. Mais l'existence de cette substance n'explique que partiellement le phénomène. En effet, les sérums absorbés par des bactéries possédant l'antigène de Rantz, continuent d'agglutiner L. monocytogenes (62).

La source de réactions croisées la plus importante semble être représentée par certaines souches de staphylocoques (75), et d'entérocoques. Plus de la moitié des souches d'entérocoques provoquent l'apparition d'anticorps contre Listeria. Il est intéressant, par contre, de constater que les souches de Listeria ne provoque l'apparition d'anticorps hétérologues que contre très peu de souches d'entérocoques (28).

L'existence de ces réactions croisées a posé le problème de l'augmentation de la spécificité des réactions sérologiques de Listeria. Plusieurs techniques, plus ou moins valables, ont été étudiées.

L'analyse des anticorps contre L. monocytogenes révèle qu'il s'agit de deux sortes de molécules: d'une part de molécules ayant une constante de sédimentation de 19S et pouvant être, en gros, assimilées aux IgM, d'autre part de molécules de 7S correspondant aux IgG. Les anticorps du type 7S sont produits comme réponse directe au stimulus antigénique; ils ont une spécificité élevée et ils provoquent, in vitro, la précipitation d'un extrait de cellules de L. monocytogenes. Au contraire, la fraction 19S est moins spécifique et elle ne donne pas une précipita-

tion avec l'extrait de cellules listériques (3). Il a donc été proposé de traiter les sérums au 2 - mercaptoéthanol, un agent réducteur qui élimine complètement l'activité des anticorps 19S (IgM) et qui met ainsi, en évidence, les anticorps 7S (IgG) (3, 63). Les résultats obtenus avec cette méthode furent encourageants, mais il a été constaté que, d'une part, certaines IgG sont sensibles au 2 - mercaptoéthamol (1), d'autre part, ce traitement n'élimine pas toutes les réactions croisées (47).

Une autre technique qui a été proposée pour augmenter la spécificité des réactions sérologiques, est la trypsinisation des antigènes de L. monocytogenes (64). Le mécanisme de l'action de ce traitement reste assez obscur. L'examen de la cellule listérique au microscope électronique (20), révèle une surface irrégulière qui peut absorber du matériel, soit d'origine étrangère, soit excrété par la bactérie. Or, il se peut que la trypsinisation enlève précisément ce matériel et "découvre" ainsi les antigènes somatiques de L. monocytogenes.

Mais les meilleurs résultats ont été obtenus par l'absorption du sérum avec des antigènes staphylococciques et streptococciques (10, 47, 74). Cette technique, combinée avec la trypsinisation des antigènes (1 ^{o}/oo de trypsine pendant 15 minutes à 37^{o}C) semble éliminer un pourcentage très élevé de réactions croisées (47).

L'ensemble des renseignements et des considérations susmentionnées trace les limites de la sérologie de Listeria et il indique les précautions à prendre au niveau des techniques utilisées. Dans ce contexte, des taux égaux ou supérieurs à 1/320 en séro-agglutination et 1/10 en fixation du complément, peuvent être considérés comme significatifs (10, 12). Il est préférable de pouvoir disposer de deux ou trois échantillons du sérum du malade prélevés à 15 jours d'intervalle et d'essayer de mettre en évidence une éventuelle modification du taux d'anticorps. Toutefois, il ne faut pas perdre de vue qu'une sérologie négative n'exclut pas toujours l'infection listérique.

1.6. Isolement de L. monocytogenes

Sa mise en évidence est possible à partir de produits pathologiques divers (L.C.R., sang, meconium, prélèvements vaginaux, cutanés, rhinopharyngés, oculaires, etc.). Elle constitue, jusqu'à ce jour, la seule preuve irréfutable d'une infection listérique.

L'examen microscopique du meconium est essentiel pour un diagnostic précoce de la listériose néonatale. La présence de bacilles à Gram positif doit être considérée comme un signe de présomption de listériose et elle doit conduire à l'antibiothérapie dans l'attente des résultats de la culture (10). Il est même recommandé de pratiquer cet examen, systématiquement, chez les prématurés.

Dans les produits pathologiques, les bactéries sont, soit libres, soit à l'intérieur des cellules mononucléaires. Lorsque leur nombre est élevé et qu'elles ne sont pas mélangées à d'autres bactéries, la culture sur les milieux bactériologiques usuels ne présente pas de difficultés majeures. Par contre, la primoculture, à partir de prélèvements polymicrobiens ou de tissus est, souvent, très difficile. Murray et col. avaient déjà signalé ce problème dans leur rapport original en 1926. Pour contourner cette difficulté, différents procédés d'enrichissement et différents milieux sélectifs ont été proposés.

La technique la plus utilisée est l'enrichissement par le froid, proposée par Gray (27). Une suspension du matériel à examiner (matières fécales, écouvillons génitaux, tissus macérés, etc.) est conservée dans du bouillon nutritif à + 4°C pendant plusieurs mois et, chaque semaine, on renouvelle les tentatives d'isolement. Les résultats que l'on obtient sont souvent surprenants. On arrive ainsi à isoler L. monocytogenes à partir de matériel dont l'examen direct ainsi que la primoculture ont été négatifs. Même quand l'examen direct montre de nombreux bacilles gram positif, il arrive que la primoculture soit négative et que plusieurs semaines de réfrigération soient nécessaires avent d'obtenir l'isolement de Listeria. Par exemple, au cours d'une étude de la vaginite listérique (58), l'inoculation expérimentale du vagin des lapins a provoqué une

vaginite purulente et, par la suite, une infection ancendante de l'endometrium. Chez les animaux portants, l'infection s'est concentrée sur le site de l'implantation du placenta, provoquant une panmétrite purulente et une nécrose du placenta résultant ainsi l'interruption de la gestation. Grossièrement, les lésions apparaissaient comme des abcès sur la paroi d'utérus. Or, les cultures directes, à partir de ces abcès, n'ont pas permis l'isolement de Listeria monocytogenes. Par contre, cet isolement a pu être effectué par la réfrigération des tissus macérés, après un mois pour les abcès et trois mois pour les tissus vaginaux. Le mécanisme de cet enrichissement reste encore obscur. Le phénomène ne peut pas être expliqué seulement par la capacité de L. monocytogenes de se multiplier à basse température (24). On a avancé plusieurs hypothèses concernant: la destruction par le froid d'éventuelles substances inhibitrices, le déclenchement de réactions enzymatiques, l'implication de formes L, etc. Mais aucune de ces hypothèses n'a pu être formellement prouvée.

Pour l'isolement sélectif de L. monocytogenes, à partir de prélèvements polymicrobiens, de nombreux milieux ont été étudiés. Il convient de citer le milieu au tellurite de potassium (25), l'utilisation de la guanofuracine (78), le procédé de McBride et Girard (55) qui consiste à utiliser un milieu d'enrichissement à la nitrofurazone et d'un milieu sélectif à base de phényl-éthanol, de glycine et de chlorure de lithium, le milieu au thiocyanate de potassium (48), le milieu à l'acide nalidixique (5), le milieu à l'acétate de thallium et à l'acide nalidixique (44), le milieu à la trypaflavine et à l'acide nalidixique (68), la combinaison d'antibiotiques et du bleu de méthylène (18), ainsi qu'un milieu synthétique minimal (9).

Toutes les méthodes et tous ces milieux sélectifs ont été souvent testés, comparés ou modifiés afin d'améliorer leur efficacité (6, 42, 61, 94). Mais les résultats obtenus ne peuvent être considérés que partiellement satisfaisants. Les raisons d'échec les plus fréquemment enregistrées sont, soit l'inhibition de certaines souches de L. monocytogenes, soit la croissance gênante d'autres espèces bactériennes.

En ce qui concerne l'enrichissement à + 4°C, qui donne de bons résultats, il y a deux constatations à faire: d'une part, le fait que certains saprophytes, tels que Proteus ou des entérocoques, peuvent aussi se multiplier à cette température, limite son efficacité (45); d'autre part, sa lenteur (quelques semaines ou, parfois, quelques mois) est incompatible avec les impératifs de la clinique (10).

Il existe donc un besoin réel pour une méthode, rapide et efficace, d'isolement sélectif de L. monocytogenes (7). Cette constatation fut à l'origine de notre travail dont les résultats sont exposés par la suite.

Deuxième partie

Introduction

La culture et l'isolement de L. monocytogenes à partir de matériel qui, d'habitude, est libre de bactéries (sang, LCR, méconium), ne pose pas de problèmes particuliers, à condition, toutefois, que les germes y soient en assez grand nombre. Mais lorsque L. monocytogenes se trouve dans certains tissus ou certains produits pathologiques polymicrobiens, sa croissance et son isolement s'avérent peu aisés.

Le problème que constitue l'isolement de la bactérie à partir de tissus infectés n'est pas encore suffisamment étudié. Le fait que la seule méthode valable (enrichissement à $+4^{o}C$) pour cet isolement, date de 1948 (27), indique que la recherche sur ce sujet n'a pas encore donné les résultats escomptés.

Par contre, l'isolement de L. monocytogenes à partir de prélèvements polymicrobiens semble avoir attiré beaucoup plus l'attention des chercheurs, du moins si on en juge par le nombre de milieux sélectifs proposés. En effet, on est, depuis longtemps, à la recherche d'un inhibiteur ou d'une combinaison d'inhibiteurs qui rendra possible l'isolement sélectif de cette bactérie. On a ainsi exploré une large gamme de produits comprenant antibiotiques, colorants et d'autres substances chimiques. Cette recherche a debouché sur une multitude de propositions de milieux sélectifs qui a souvent contribué à la création d'une certaine confusion. Ainsi, tel groupe de bactériologistes préfére certaines de ces combinaisons que les autres trouvent inefficaces et vice versa. Ceci provient, principalement, des inconvénients inhérents à l'utilisation de substances inhibitrices. Un inhibiteur n'est jamais inoffensif, même pour la bactérie dont il favorise l'isolement. Il s'agit alors de trouver la concentration favorable, qui établi un équilibre optimum entre la croissance de la bactérie recherchée et l'inhibition des bactéries gênantes. Cet équilibre est souvent instable et le risque est considérable d'eliminer des souches sensibles de la bactérie recherchée ou de sélectionner des souches résistantes des bactéries indésirables.

L'étude des antibiotiques a mis en evidence l'utilité de l'acide nalidixique comme inhibiteur des bactéries gram négatif et plus spécialement des entérobactéries (5).

Par contre, l'étude des colorants n'a pas donné de résultats encourageants (65). Cependant, Gray et Killinger, en 1966, exprimaient déjà leur conviction que les possibilités offertes par les colorants n'étaient pas suffisamment explorées (24). Cette conviction nous a incité d'inclure dans notre étude quelques colorants et nous avons pu, ainsi, constater que certains d'entre eux peuvent, effectivement, être utiles pour l'isolement sélectif de L. monocytogenes.

2.1. Matériel et méthodes

2.1a. Souches bactériennes

Les souches de L. monocytogenes ont été obtenues par la "Listeria Culture Collection of the Hygiene Institute in Würzburg, Germany" et elles ont été lyophilisées et gardées dans la collection bactérienne de l' "Internationale center for information on and distribution of type-cultures, Lausanne". Nous avons utilisé les serovars suivants: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 4a, 4b, 4ab, 4c et 4d.

Les souches de Streptococcus faecalis, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacteriaceae, Corynebacterium spp, Bacillus spp et levures utilisées étaient des souches fraîchement isolées par les laboratoires de diagnostic de notre Institut. La raison pour laquelle nous avons préféré utiliser des souches "sauvages" est leur plus grande résistance aux inhibiteurs.

2.1b. Milieux

Toutes les souches bactériennes ont été entretenues par repiquages hebdomadaires sur gélose Mueller-Hinton (BBL) et gardées à $4^{o}C$.

Le bouillon Todd-Hewitt (BBL) a été utilisé comme milieu de base. Dans ce milieu, les produits chimiques à tester, ont été incorporés selon les besoins des essais. L'étude de chaque produit chimique commençait par la recherche de l'effet inhibiteur de cinq dilutions de ce produit sur les souches-tests. Ces dilutions initiales étaient: 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}. Le terme "dilution", dans le cadre de ce travail, exprime le rapport volume/volume des composés liquides dans le milieu ou le rapport poids/volume des produits solides solubles. Les tubes étaient inoculés par une goutte d'une culture liquide de 18-24 heures de la souche à tester et ils étaient, par la suite, incubés à $37^{o}C$ et observés pendant trois jours. La croissance était estimée par l'apparition

d'un trouble visible dans les tubes inoculés. Pour les substances qui coloraient fortement le milieu, l'estimation de la croissance s'est faite par repiquage sur la gélose de Mueller-Hinton. Les résultats obtenus dans ces cinq dilutions initiales ("initial screening") orientaient la suite des recherches pour la définition des concentrations-limites permettant la croissance des espèces bactériennes utilisées.

1c. Produits chimiques testés

1. Acétate de sodium
2. Acétate de thallium
3. Acétone
4. Acide nalidixique
5. Acide tannique
6. Alginate de sodium
7. Alizarine
8. 2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol
9. p-amino-salicylate de sodium
10. Benzoate de sodium
11. Bichromate de potassium
12. Bleu alcian
13. Bleu de méthylène
14. Bleu Victoria
15. Butanol
16. Caprylate de sodium
17. Carbonate de potassium
18. Carmin d'indigo
19. Chlorhydrate d'hydroxylamine
20. p-chloro-crésol
21. Chlorure d'éthylbenzyl diméthylammonium
22. Chlorure de césium
23. Chlorure de magnésium
24. Chlorure de sodium
25. Citrate[1)]
26. Désoxycholate de sodium
27. Dithionite de sodium
28. Ethyl acétamide
29. Ethylène-glycol
30. Formol
31. Gallocyanine
32. Glycérol
33. Glycine
34. Hématoxyline
35. Hydroxyacétate de sodium
36. Iode
37. Lactate[1)]
38. Lauryl sulfate de sodium
39. Malonate[1)]
40. Merthiolate[R]
41. Néotétrazol · HCl
42. Nitrate d'ammonium
43. Nitrate d'argent

44. β β'β'' nitrilotripropionamide
45. Nitrite de sodium
46. Orange d'acridine
47. Orcéine
48. Panthonate de calcium
49. Peroxyde d'hydrogène
50. Persulfate d'ammonium
51. Phénol
52. Phénolphtaléine
53. Phényléthyl-acétamide
54. Phosphate[1)]
55. Phosphate diammonique
56. Phosphomolybdate[1)]
57. Picrate[1)]
58. Propylène-glycol
59. Pyrazine-carboamide
60. Pyrocathécol
61. Pyronine
62. Safranine
63. Sélénite de strontium
64. Solution iodo-iodurée
65. Succinimide
66. Sulfate d'ammonium
67. Sulfate double d'aluminium et de potassium
68. Sulfate de zinc
69. Sulfite de sodium
70. Tartrazine
71. Taurocholate de sodium
72. Tellurite de potassium
73. Tergitol 7
74. Thiocarbonamide
75. Thionine
76. Trioxyde de chrome
77. 2,3,5-triphényl-tétrazol HCl
78. Tris(hydroxyméthyl)-amino-méthane
79. Trypaflavine
80. Vert brillant
81. Vert de malachite
82. Violet cristal
83. Violet de gentiane

---

1) Produit incorporé au milieu sous forme d'acide.

2.2. Résutats

Les résultats obtenus, concernant chaque espèce bactérienne testée, sont exposés sur les figures 1, 2, 3, 4, 5. Sur ces figures nous avons reporté la "dernière dilution négative" et la "première dilution positive". Comme "dernière dilution négative" nous avons considéré, pour une substance donnée, la plus faible concentration testée, qui inhibe la croissance de toutes les souches testées de l'espèce bactérienne considérée. "Première dilution positive" est la plus forte concentration, qui permet la croissance de toutes les souches testées, en ce qui concerne L. monocytogenes, ou la croissance d'une partie des souches testées, en ce qui concerne les autres espèces bactériennes.

L'analyse de ces résultats a attiré notre attention sur la valeur du bichromate de potassium pour l'élimination de Streptococcus faecalis, qui constitue le problème majeur dans le cadre de l'isolement sélectif de L. monocytogenes.

Le fait que nous n'avons pas trouvé, parmis les produits testés, une substance inhibant, de manière satisfaisante, les staphylocoques par rapport à la L. monocytogenes, nous a incité à tester différentes combinaisons de substances. Ainsi, nous avons constaté que la combinaison de bichromate de potassium avec la thionine exerce un effet inhibiteur sur la croissance des entérocoques et des staphylocoques beaucoup plus prononcé que chaque substance prise séparément. Par contre, la croissance de L. monocytogenes ne semble pas être affectée par cette combinaison de substances. Cette constatation fût à la base du milieu sélectif que nous avons élaboré.

2a. Méthode d'isolement sélectif de L. monocytogenes

Hormis le milieu sélectif pour l'enrichissement de la listéria (milieu liquide), nous avons également élaboré un milieu solide pour la différentiation des colonies de cette bactérie. L'adjonction, dans ce milieu, de

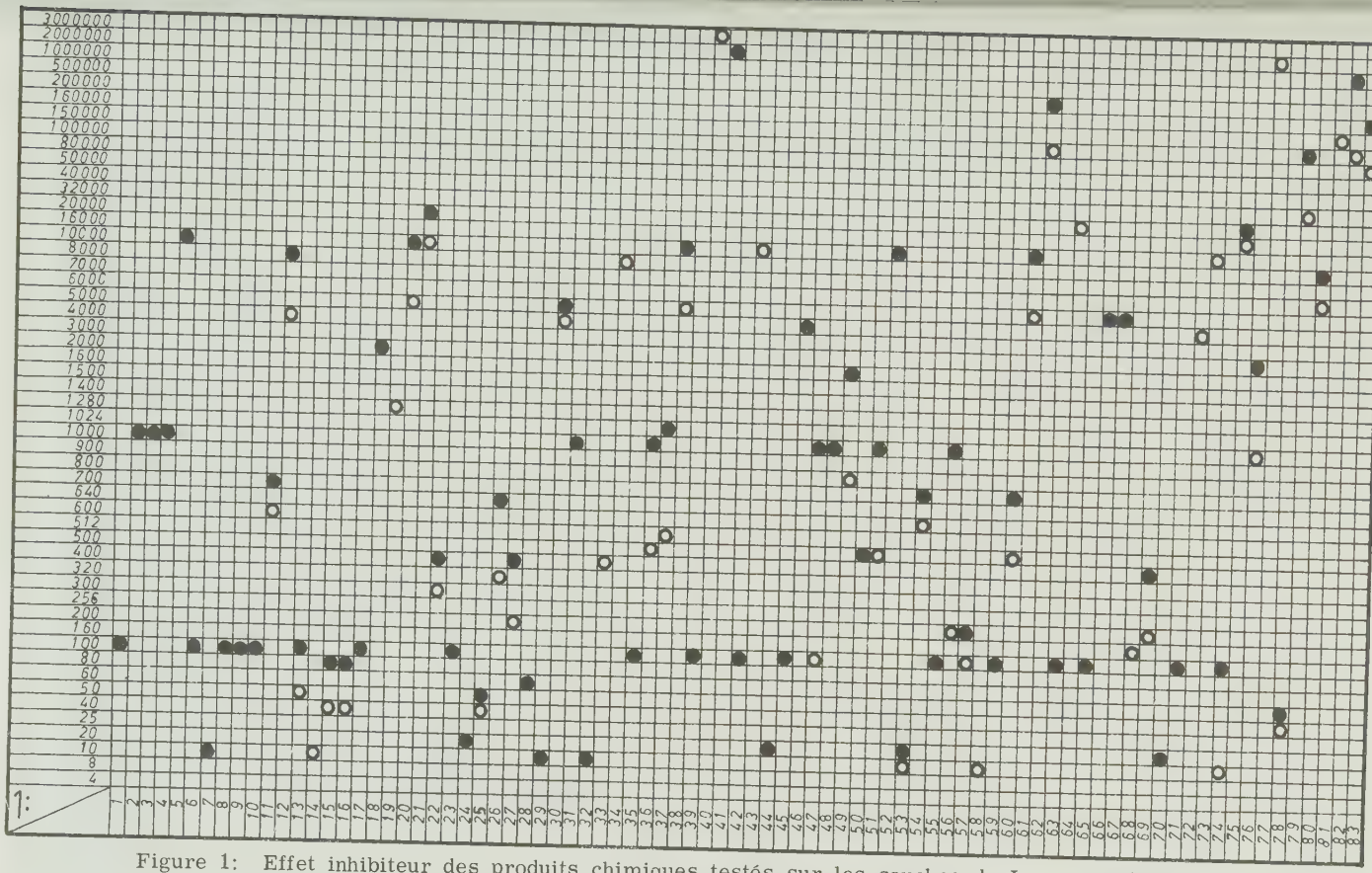

Figure 1: Effet inhibiteur des produits chimiques testés sur les souches de L. monocytogenes. (○) dernière dilution négative, (●) première dilution positive. Les chiffres sur l'abscisse correspondent aux produits chimiques testés (voir texte sous 2.1c)

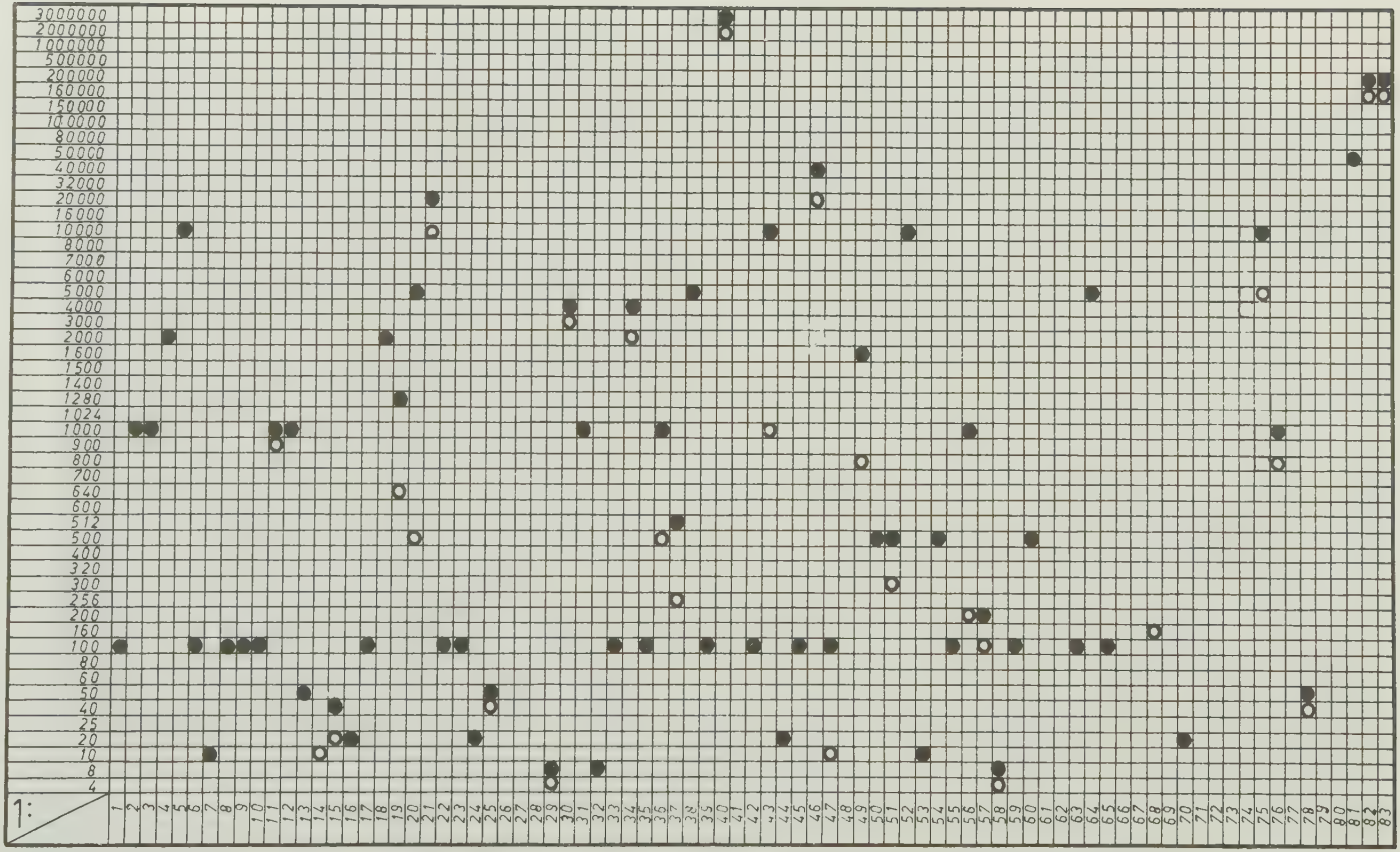

Figure 2: Effet inhibiteur des produits chimiques testés sur les souches de Str. faecalis.
(○) dernière dilution négative, (●) première dulution positive. Les chiffres sur l'abscisse correspondent aux produits chimiques testés (voir texte sous 2.1c)

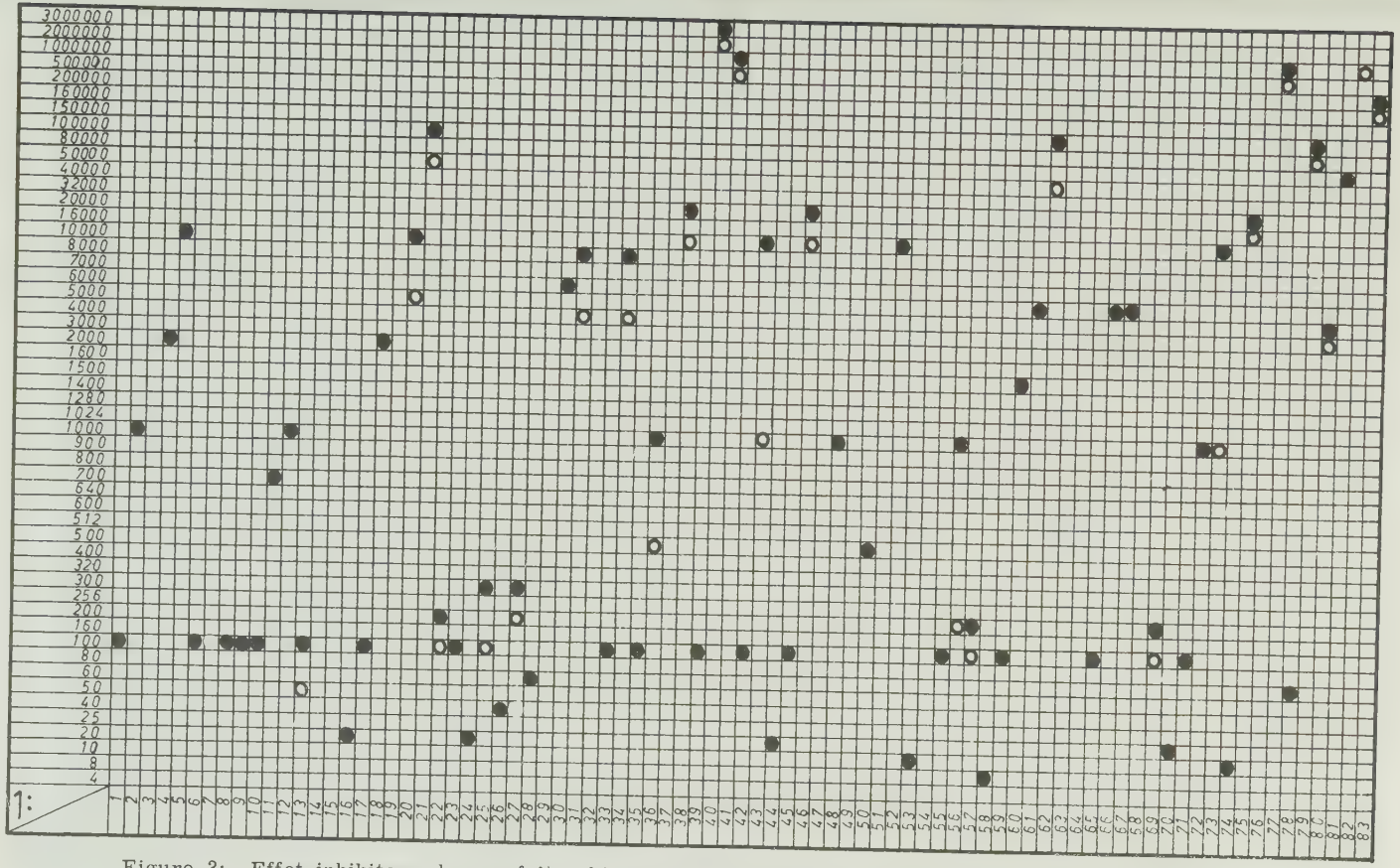

Figure 3: Effet inhibiteur des profuits chimiques testés sur les souches de Staphylococcus spp. (○) dernière dilution négative, (●) première dilution positive. Les chiffres sur l'abscisse correspondent aux produits chimiques testés (voir texte sous 2.1c)

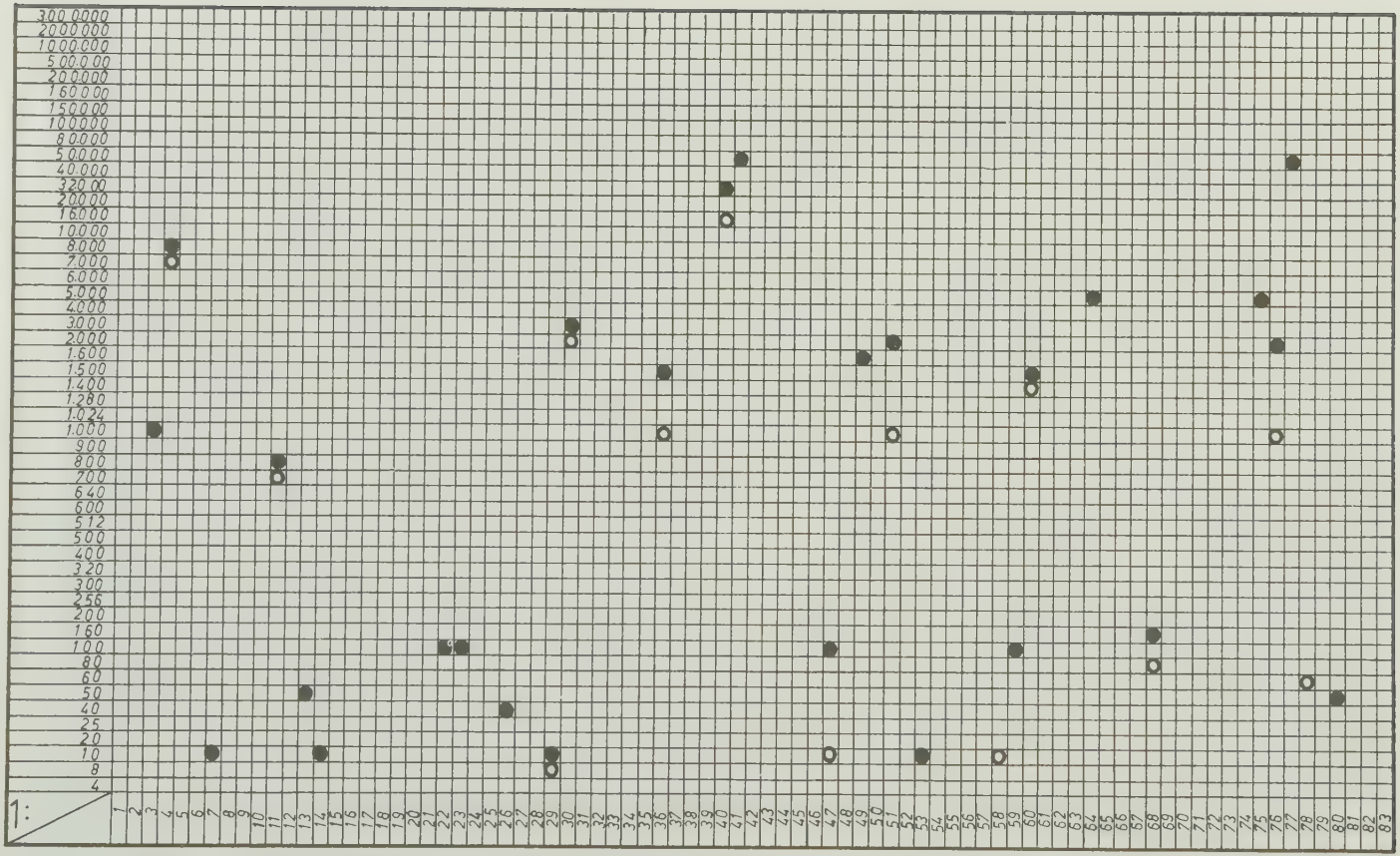

Figure 4: Effet inhibiteur des produits chimiques testés sur les souches de Pseudomonas aeruginosa. (○) dernière dilution négative, (●) première dilution positive. Les chiffres sur l'abscisse correspondent aux produits chimiques testés (voir texte sous 2.1c)

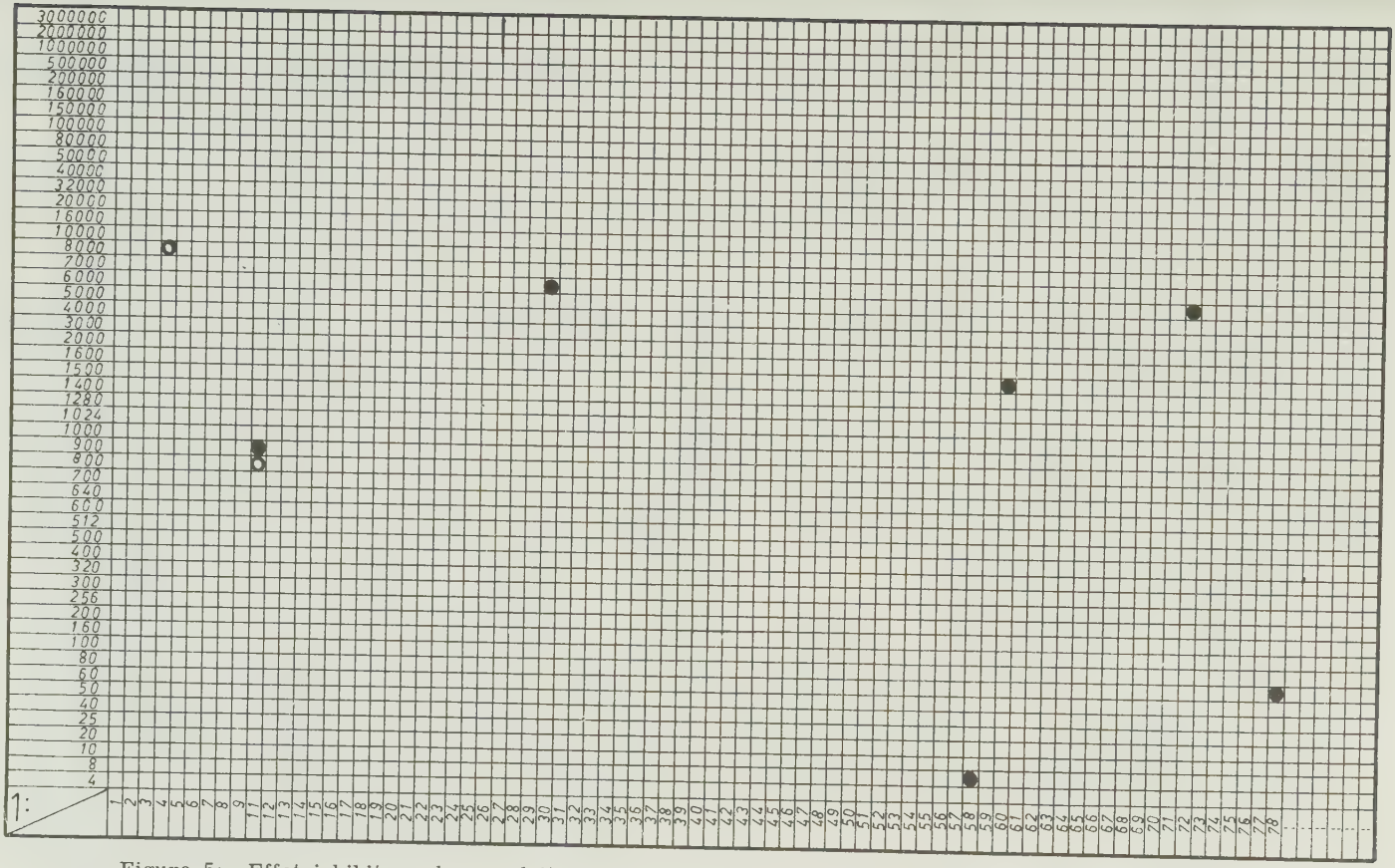

Figure 5: Effet inhibiteur des produits chimiques testés sur les souches des Enterobacteriaceae. (○) dernière dilution négative, (●) première dilution positive. Les chiffres sur l'abscisse correspondent aux produits chimiques testés (voir texte sous 2.1c)

gallocyanine et de pyronine accentue la coloration bleue-verte que les colonies de listéria présentent sur les géloses transparentes quand elles sont éclairées obliquement selon la technique de Henry (32). Sur ce même milieu, les colonies des autres espèces bactériennes, observées par la même technique (transillumination oblique), aparaissent colorées en rose ou rouge.

La composition de deux milieux en question est la suivante:

- Bouillon d'enrichissement de listéria (LEB)

Bouillon Todd-Hewitt (BBL)		30 g
Bichromate de potassium	5 % soln	16,6 ml
Trioxyde de chrome	10 % soln	2 ml
Thionine	0,25% soln	20 ml
Acide nalidixique	1 % soln	10 ml
Amphotéricine B		3000 iu
Eau distillée	ad	1000 ml

- Agar de différentiation de listéria (LDA)

Trypticase soy agar (BBL)		40 g
Gallocyanine	0,5 % soln	10 ml
Pyronine	0,5 % soln	1 ml
Acide nalidixique	1 % soln	10 ml
Eau distillée	ad	1000 ml

La méthode de préparation de solutions-mères de différents substances employées est donnée au Tableau 4.

Les solutions de bichromate de potassium, de trioxyde de chrome et de l'amphotéricine B doivent être ajoutées après stérilisation du milieu à 115°C pendant 20 minutes et refroidissement de celui-ci à 60-70°C. Il en va de même pour la gallocyanine.

Croissance des souches pures en LEB: Toutes les souches des Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, Corynebacterium spp et Bacillus spp utilisées furent totalement inhibées à 30°C, même quand elles étaient abondamment inoculées.

Tableau 4: Substances inhibitrices et préparation de leurs solutions-mères.

Substance	Fabriquant	Solution-mère (%)	Solvant	Remarques
Thionine	Merck	0,25	Glycérol	Chauffer à 70°C jusqu'à dissolution complète. Ne pas autoclaver.
Bichromate de potassium	Fluka	5	Eau distillée	Ne pas autoclaver.
Trioxyde de chrome	Merck	10	Eau distillée	Ne pas autoclaver.
Gallocyanine	Fluka	0,5	Eau distillée	Ajouter N NaOH goutte à goutte jusqu'à dissolution complète. Ne pas autoclaver.
Pyronine	Merck	0,5	Eau distillée	Peut être autoclavé.
Acide nalidixique (Negram)	Winthrop	1	Eau distillée	Ajouter N NaOH goutte à goutte jusqu'à dissolution complète. Peut être autoclavé.

Par contre, L. monocytogenes a montré une croissance rapide en LEB, même avec un inoculum réduit (Fig. 6 et 7). Une incubation de 24 heures à 30°C était, généralement, suffisante pour obtenir une croissance satisfaisante de toutes les souches de listéria. La seule exception fut une souche du serovar 3a dont la croissance en LEB était plus lente que celle des autres serovars de listéria (Fig. 6) et dont les cellules bactériennes, après passage dans LEB, apparaissaient au microscope longues ou filamenteuses.

Quelques souches de Str. faecalis et de staphylocoques se sont montrées capables de croître en LEB à 30°C (Fig. 8 et 9). Mais leur croissance était plus lente que celle des souches de listéria.

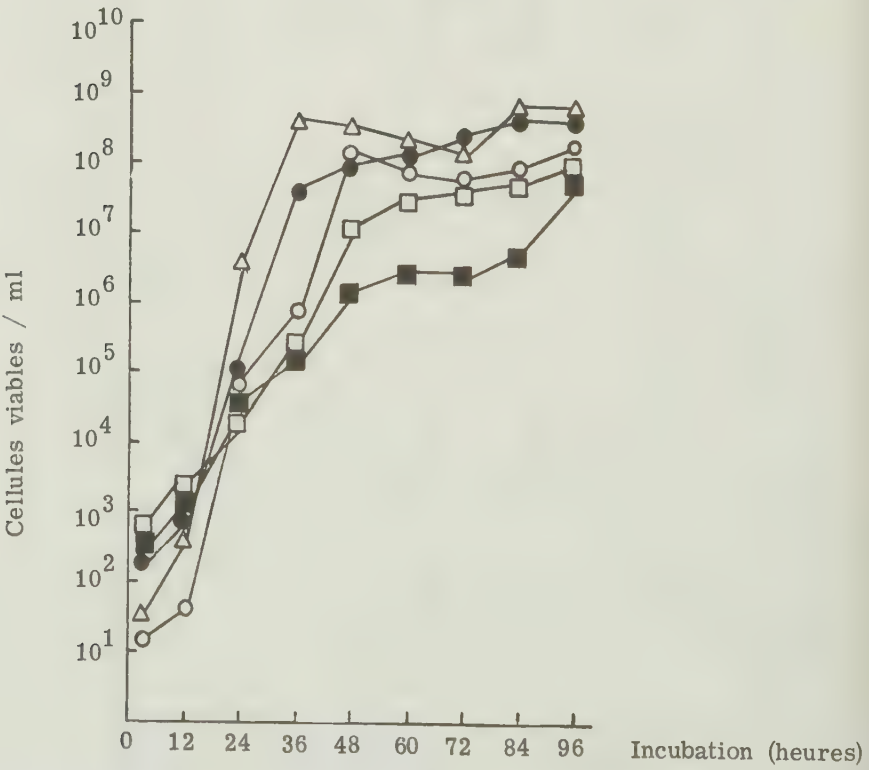

Figure 6: Courbes de croissance de L. monocytogenes dans LEB à 30°C. Serovars 1/2a (○), 1/2b (●), 1/2c (□), 3a (■), 3b (△)

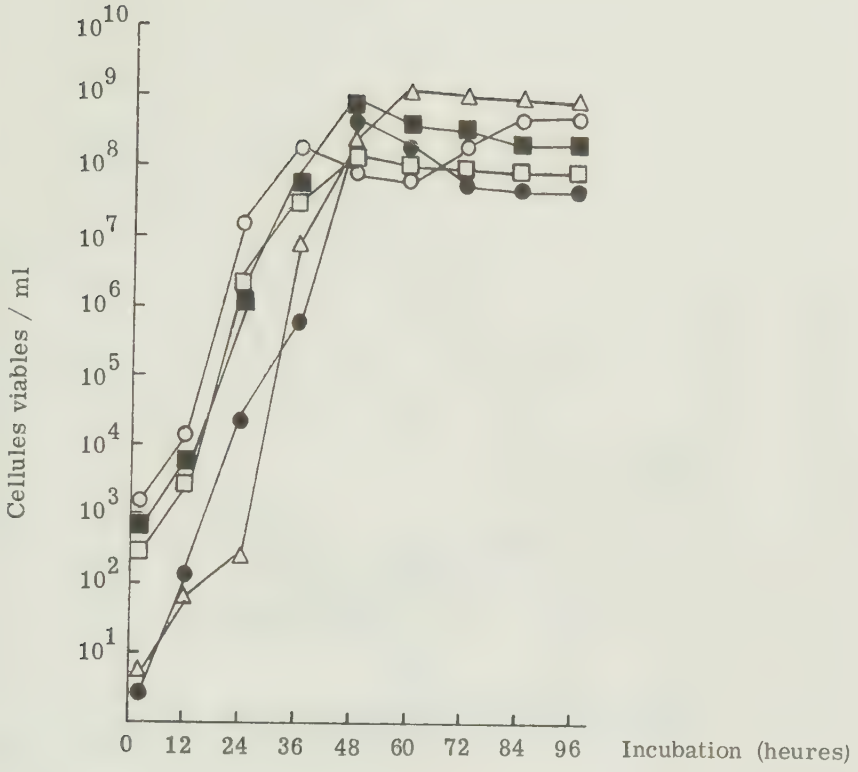

Figure 7: Courbes de croissance de L. monocytogenes dans LEB à 30°C. Serovars 4a (○), 4b (●), 4ab (□), 4c (■), 4d (△)

Croissance des souches pures sur LDA: Les souches des Enterobacteriaceae et de Corynebacterium spp étaient totalement inhibées sur ce milieu.

Les colonies de listéria sur LDA, observées avec la technique de la transillumination oblique et à l'aide d'une loupe (4X), apparaissent colorées en bleu-vert, ce qui les différencie bien des colonies des autres espèces bactériennes qui sont colorées en rose ou rouge. Il convient de faire la lecture après une incubation de 48 heures à 37°C en raison de la meilleure différentiation qu'on obtient avec de colonies bien développées.

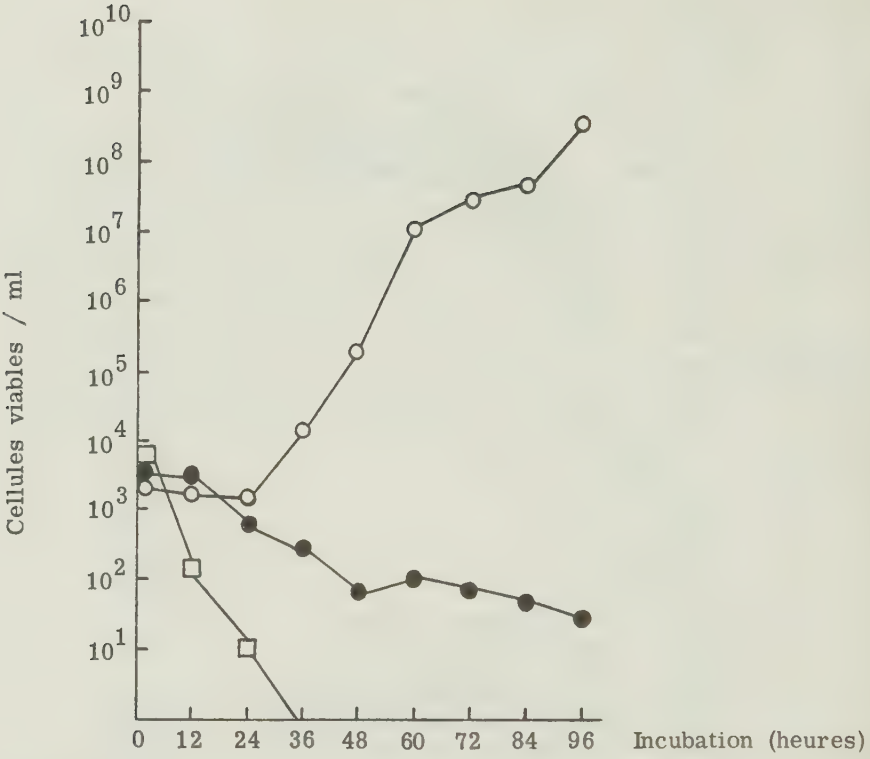

Figure 8: Courbes de croissance de quelques souches de Str. faecalis dans LEB à 30°C.

Exceptionnellement, quelques souches de Str. faecalis peuvent former sur LDA des colonies légèrement bleutées, mais avec un peu de pratique on arrive à les distinguer des colonies de listéria. Toutefois, la différentiation doit être completée avec une coloration de Gram, la recherche de la catalase et la fermentation des sucres.

Le milieu LDA n'exerce pas un effet inhibiteur sur L. monocytogenes. Des essais comparatifs avec deux milieux de contrôle non inhibiteurs (gélose au sang et gélose Mueller-Hinton) ont prouvé que la croissance de la bactérie sur LDA était aussi bonne que sur les milieux de contrôle (Tableau 5).

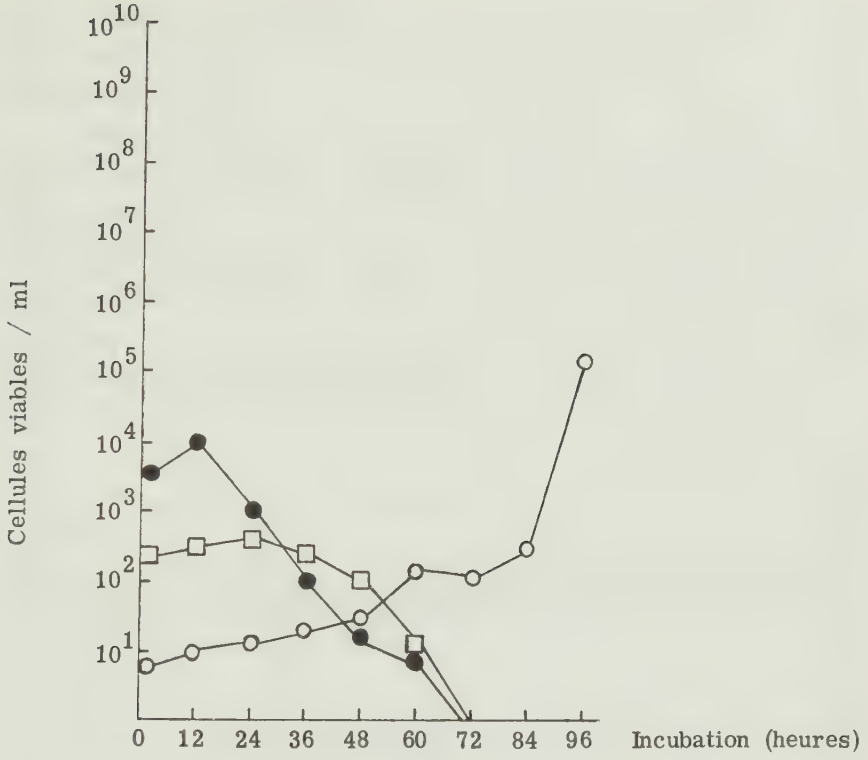

Figure 9: Courbes de croissance de quelques souches de Staphylococcus spp dans LEB à 30°C.

A la suite de ces résultats encourageants obtenus avec des souches pures, nous avons voulu tester les deux milieux (LEB et LDA) avec un matériel polymicrobien (selles), artificiellement contaminé avec L. monocytogenes. De cultures de la bactérie furent, après incubation de 18 heures à 37°C, diluées en series de raison 10. 0,1 ml de chaque dilution était directement ensemencé sur gélose au sang pour dénombrement des colonies et 0,1 ml était inoculé dans 5 ml de LEB. Ces tubes de LEB reçevaient également 2-3 g de matière fécale qui était, par la suite, bien homogénéisée. Le nombre des cellules de listéria par millilitre de ces tubes était considéré comme l'inoculum listérique. On

Tableau 5: Dénombrements comparatifs des colonies de L. monocytogenes sur LDA, gélose au sang et gélose Mueller-Hinton obtenus en trois expériences indépendantes A, B et C.

Serovars de Listeria monocytogenes	LDA			Gélose au sang			Gélose Mueller-Hinton		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1/2a	476	89	192	533	98	154	512	80	200
1/2b	468	103	116	444	111	126	466	103	91
1/2c	400	26	88	416	36	88	416	31	112
3a	289	240	53	270	250	56	245	228	52
3b	216	120	22	230	63	41	219	125	24
4a	119	225	63	168	218	86	145	260	63
4b	778	66	123	968	85	128	741	66	113
4ab	236	458	28	267	422	32	227	337	26
4c	434	192	79	446	115	76	374	154	77
4d	349	250	104	355	220	130	305	290	106
Nombre total de colonies pour chaque expérience:	3765	1769	868	4097	1618	917	3650	1674	864
sur chaque milieu:		6402			6632			6188	

laissait ces tubes sedimenter, à temperature ambiante, pendant 15-30 minutes après quoi, le surnageant était analysé suivant le schéma d'isolement de la Fig. 10.

Tous les serovars de L. monocytogenes furent facilement réisolés dans les cas où la matière fécale était contaminée par 100 ou plus cellules listériques/ml. Lorsque l'inoculum contenait 50-100 cellules listériques/ml. le taux de réisolement était 80-90% des échantillons contaminés. Les serovars les plus difficiles à isoler étaient le 3a et le 1/2c. En revanche, les autres serovars étaient, occasionnellement, réisolés à partir des échantillons contaminés avec de très petits inocula de l'ordre de 7-10 cellules listériques/ml.

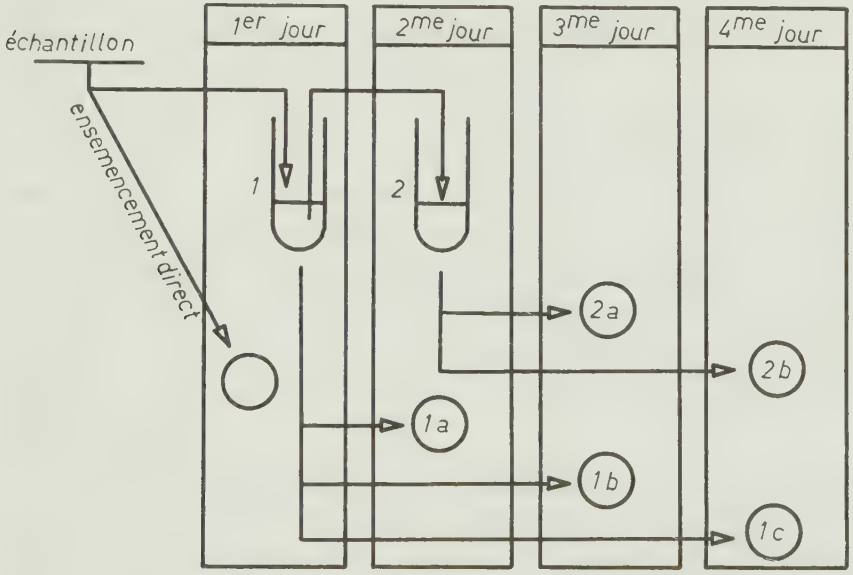

Figure 10: Schéma d'isolement sélectif de L. monocytogenes. La proportion finale de l'échantillon (selle, expectoration, etc.) ne doit pas dépasser, dans le tube no 1, le dixième du volume du LEB.

Des nombreuses procédures d'isolement testées, celle qui est présentée sur la Fig. 10 nous paraît la plus efficace pour la recherche systématique de L. monocytogenes dans les produits pathologiques polymicrobiens. Il s'agit d'une procédure dont la durée est de 4 jours et qui consiste à un enrichissement dans LEB à 30°C, suivit par un isolement sur LDA à 37°C. La lecture des boîtes de Petri de LDA doit se faire avec la méthode de la transillumination oblique de Henry, ce qui fait paraître les colonies de listéria colorées en bleu-vert, tandis que les colonies des autres espèces bactériennes paraissent en rose ou rouge. Les colonies suspectes doivent être contrôlées par la coloration de Gram, la recherche de catalase et la fermentation des sucres.

3. Discussion et conclusion

La majorité des auteurs semble être d'accord sur le fait que l'absence d'une méthode sélective, rapide et efficace, pour l'isolement de L. monocytogenes constitue un obstacle majeur à l'étude de la listériose. Ceci expliquerait également les nombreux milieux sélectifs proposés. Au cours de ce travail nous avions l'occasion de constater que certaines substances inhibitrices contenues dans ces milieux, telle que tellurite de potassium, trypaflavine ou acétate de thallium, permettent la croissance d'autres espèces bactériennes, essentiellement d'entérocoques et de staphylocoques, à des concentrations qui inhibent certaines souches de L. monocytogenes. Pour cette raison nous n'avons retenu pour notre travail que deux éléments, précédemment proposés, qui nous paraissent valables: l'utilisation de l'acide nalidixique comme agent inhibiteur des Enterobacteriaceae (5) et la temperature de 30°C, temperature optima pour la croissance de L. monocytogenes (44).

Les résultats obtenus avec LEB indiquent que l'association des substances proposées assure un enrichissement satisfaisant de L. monocytogenes dans les cas où cette bactérie se trouve en compétition avec une flore polymicrobienne. Mais il va de soi que, comme tout agent inhibiteur, ces substances ne sont pas complètement inoffensives pour L. monocytogenes. Ceci est particulièrement vrai pour le bichromate de potassium qui, en la concentration proposée, nous a paru ralentir quelque peu la croissance des souches des serovars 3a et 1/2c utilisées (Fig. 6).

L'avantage déterminant de la méthode d'isolement sélectif que nous proposons est sa rapidité. En effet, quoique le schéma d'isolement porte sur une durée de quatre jours, nous avons pu isoler L. monocytogenes de la majorité des échantillons de matière fécale artificiellement contaminés dans les premières 48 heures et, parfois, déjà en culture pure.

Le contaminant le plus fréquemment présent dans LEB était Str. faecalis. Mais ses colonies roses sur LDA sont facilement différentiées des colonies bleues de L. monocytogenes.

Les quelques échecs de récuperer L. monocytogenes à partir de selles contaminées avec un très petit inoculum peuvent, probablement, être expliqués ou bien par la présence de différents facteurs inhibiteurs (i.e. antibiotiques) ou par l'influence directe de la flore intéstinale. Il est prouvé, par exemple, que certaines souches de Bacillus spp exercent une action inhibitrice sur L. monocytogenes (46).

Enfin, l'utilisation de LDA a grandement facilité la différentiation des colonies de L. monocytogenes même dans les cas où le milieu était encombré par une croissance abondante d'autres espèces bactériennes.

2.4. Résumé

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'effet inhibiteur de nombreux composés chimiques sur la croissance des espèces suivantes: L. monocytogenes, Streptococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa, entérobactéries diverses, Corynebacterium spp., Bacillus spp. et quelques souches de levures.

Cette étude a permis l'élaboration d'un milieu sélectif liquide pour l'enrichissement de L. monocytogenes à partir de produits pathologiques polymicrobiens (bouillon Todd-Hewitt additionné de bichromate de potassium, de trioxyde de chrome, de thionine, d'acide nalidixique et d'amphotéricine B) et d'un milieu solide pour la différentiation des colonies de L. monocytogenes ("trypticase soy agar" additionné de gallocyanine, de pyronine et d'acide nalidixique).

L. monocytogenes se développe bien, à l'exception de deux serovars, dans le milieu sélectif liquide (LEB), aussi bien si la souche est pure que si elle est mélangée à des échantillons de matière fécale.

Sur le milieu solide (LDA), les colonies de L. monocytogenes étaient facilement réconnaissables. En effet, quand on observe les boîtes de Petri avec la méthode de la transillumination oblique de Henry, les colonies de L. monocytogenes paraissent colorées en bleu-vert, tandis que les colonies des autres espèces bactériennes paraissent roses ou rouges.

Enfin, une procédure, ne durant que quatre jours, a été mise au point pour l'isolement sélectif de L. monocytogenes, au moyen des milieux proposés. Ceci contraste avec les procédures en vigueur, dont la durée est de plusieurs mois ou qui ne permettent l'isolement que de certaines souches de L. monocytogenes.

Bibliographie

1. Aalund O., Osebold J.W., Murphy F.A., di Capua R.A. 1966. Antibody heterogeneity in experimental listeriosis. J. Immunol. 97, 150.

2. Adam D., Schaffert W., Marget W. 1974. Enhanced in vitro phagocytosis of Listeria monocytogenes by human monocytes in the presence of ampicillin, tetracycline and chloramphenicol. Infect. Immun., 9, 811.

3. Armstrong A.S., Sword C.P. Immunoglobulin response in listeriosis. Dans "Proceedings of the third International Symposium on Listeriosis." Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Utrecht, 1966.

4. Asahi O., Hosoda T., Akiyama Y. 1957. Studies on the mechanism of infection of the brain with Listeria monocytogenes. Am. J. Vet. Res., 18, 147.

5. Beerens H., Tahon-Castel M.M. 1966. Milieu à l'acide nalidixique pour l'isolement des streptocoques, D. pneumoniae, Listeria, Erysipelothrix. Ann. Inst. Pasteur, Paris 111, 90.

6. Berger U., Pietsch U. 1975. Untersuchungen zur Häufigkeit der Listerienkeimträger. Med. Microbiol. Immunol., 161, 63.

7. Blenden D.C. 1974. Latency in Listeriosis: A review and assessment. Can. J. Public Health, 65, 198.

8. Bojsen-Møller J., Jessen O., Lautrop H. Human listeriosis in Denmark: 1958-74. Dans "Problems of Listeriosis". Ed. M. Woodbine, Leicester University Press, 1975.

9. Braveny I., Grote R. 1973. Ein Selektivsubstrat zur Isolierung von Listeria monocytogenes. Experientia, 29, 1553.

10. Burdin J.-C., Weber M. 1972. Aspects actuels de la listériose humaine. Bull. Inst. Pasteur, 70, 73.

11. Campbell P.A., Schuffler C., Rodriguez G.E. 1976. Listeria cell wall fraction: a B cell adjuvant. J. Immunol., 116, 590.

12. Chiron J.-P. Recherche de l'affinité cellulaire de Listeria monocytogenes in vitro et in vivo. Thèse Doct. Pharm., Tours 1974.

13. Chiron J.-P., Maupas Ph., Bind J.L. Phagic induction in Listeria monocytogenes. Dans "Problems of Listeriosis." Ed. M. Woodbine, Leicester University Press, 1975.

14. Clegg F.G. Listeric infection and the genital system. Dans "Problems of Listeriosis." Ed. M. Woodbine, Leicester University Press, 1975.

15. Cole P. 1975. Activation of mouse peritoneal cells to kill Listeria monocytogenes by T-lymphocyte products. Infect. Immun., 12, 36.

16. Cypess R.H., Lubiniecki A.S., Swidwa D.M. 1974. Decreased susceptibility to Listeria monocytogenes in mice after infection with Trichinella spiralis. Infect. Immun., 9, 477.

17. Davis G.H.G., Fomin L., Wilson E., Newton K.G. 1969. Numerical taxonomy of Listeria, Streptococci and possibly related bacteria. J. gen. Microbiol., 57, 333.

18. Despierres M. 1971. Isolement de Listeria monocytogenes dans un milieu défavorable à Streptococcus faecalis. Ann. Inst. Pasteur, 121, 493.

19. Edman D.C., Pollock M.B., Hall E.R. 1968. Listeria monocytogenes L forms. I. Induction, Maintenance and Biological characteristics. J. Bacteriol., 96, 352.

20. Edwards M.R., Stevens R.W. 1963. Fine structure of Listeria monocytogenes. J. Bacteriol., 86, 414.

21. Emmerling P., Finger H., Bockemühl J. 1975. Listeria monocytogenes infection in nude mice. Infect. Immun., 12, 437.

22. Grant J. Observations on the techniques of listeriphage assay. Dans "Problems of Listeriosis." Ed. M. Woodbine, Leicester University Press, 1975

23. Gray M.L. 1957. A rapid method for the detection of colonies of Listeria monocytogenes. Zbl. Bact. I Orig., 169, 373.

24. Gray M.L., Killinger A.H. 1966. Listeria monocytogenes and listeric infections. Bact. Rev., 30, 309.

25. Gray M.L., Stafserth H.J., Thorp F. 1950. The use of potassium tellurite, sodium azide and acetic acid in a selective medium for the isolation of Listeria monocytogenes. J. Bacteriol., 59, 443.

26. Gray M.L., Stafseth H.J., Thorp F. 1957. Colonial dissociation of Listeria monocytogenes. Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. I Orig., 169, 378.

27. Gray M.L., Stafseth H.J., Thorp F., Schol L.B., Riley W.F. 1948. A new technique for isolating Listerellae from the bovine brain. J. Bact., 55, 471.

28. Grönroos J.A. 1967. Cross-reactivity of Listeria monocytogenes and Streptococcus faecalis types as revealed by agglutination and precipitin tests and immunofluorescent staining. Ann. Med. exp. Fenn., 45, 131.

29. Hahn H. 1974. Effects of dextran sulfate 500 on cell-mediated resistance to infection with Listeria monocytogenes in mice. Infect. Immun., 10, 1105.

30. Hahn H., Bierther M. 1974. Morphological changes induced by dextran sulfate 500 in mononuclear phagocytes of Listeria-infected mice. Infect. Immun., 10, 1110.

31. Halliburton B.L., Blazkovec A.A. 1975. Delayed hypersensitivity and acquired cellular resistance in guinea pigs infected with Listeria monocytogenes. Infect. Immun., 11, 1.

32. Henry B.S. 1933. Dissociation in the genus Brucella. J. Inf. Dis., 52, 374.

33. Holder I.A., Sword C.P. 1969. Characterization and biological activity of the monocytosis producing agent of Listeria monocytogenes. J. Bact., 97, 603.

34. Hood M. Listeriosis: Louisiana 1954-1974. Dans "Problems of Listeriosis." Ed. M. Woodbine, Leicester University Press, 1975.

35. Hyslop N.St.G. Epidemiologic and immunologic factors in listeriosis. Dans "Problems of Listeriosis." Ed. M. Woodbine, Leicester University Press, 1975.

36. Ivanov I. Establishment of non-motile strains of Listeria monocytogenes type 5. Dans "Problems of Listeriosis." Ed. M. Woodbine, Leicester University Press, 1975.

37. Jenkins E.M., Adams E.W., Watson B.B. Further investigations on the production and nature of the soluble hemolysins of Listeria monocytogenes. Dans "Proceedings of the third International Symposium on Listeriosis." Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Utrecht, 1966.

38. Jones D. The taxonomic position of Listeria. Dans "Problems of Listeriosis." Ed. M. Woodbine, Leicester University Press, 1975.

39. Jones T., Youmans G.P. 1974. Nonspecific inhibition of growth of intracellular Listeria monocytogenes by lymphocyte culture products. Infect. Immun., 9, 472.

40. Kampelmacher E.H., Maas D.E., van Noorle Jansen L.M. Occurrence of Listeria monocytogenes in faeces of pregnant women with and without direct animal contact. Dans "Problems of Listeriosis." Ed. M. Woodbine, Leicester University Press, 1975.

41. Kawata T. 1963. Fine structure of intracytoplasmic membrane system in Listeria monocytogenes. J. Gen. Appl. Microbiol., 9, 1.

42. Khan M.A., Seaman A., Woodbine M. 1973. Differential media in the isolation of Listeria monocytogenes. Zbl. Bakt. Hyg., Abt. I Orig. A, 224, 362.

43. Killinger A.H., Schubert J.H. Listeric infection in man and animals in the United States. Dans "Proceedings of the third International Symposium on Listeriosis." Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Utrecht, 1966.

44. Kramer P., Jones D. 1969. Media selctive for Listeria monocytogenes. J. appl. Bact., 32, 381.

45. Kubasiak M. La listériose: Acquisitions récentes et contribution à l'étude épidémiologique. Thèse Doct. Méd., Tours 1971.

46. Larsen H.E., Gundstrup A. 1965. The inhibitory action of various strains of Bacillus on Listeria monocytogenes. Nord. Vet.Med., 17, 336.

47. Larsen S.A., Jones W.L. 1972. Evaluation and standardization of an agglutination test for human listeriosis. Appl. Microbiol., 24, 101.

48. Lehnert C. 1964. Bakteriologische, serologische und tierexperimente Untersuchungen zur Pathogenese Epizootologie und Prophylaxe der Listeriose. Arch. exp. VetMed., 18, 981.

49. Liu P.V., Bates J.L. 1961. An extracellular haemorrhagic toxin produced by Listeria monocytogenes. Can. J. Microbiol., 7, 107.

50. Louria D.B., Hensle T., Armstrong E., Collins H.S., Blevins A., Krugman D., Buse M. 1967. Listeriosis complicating malignant disease: A new association. Annls. Internal Med., 67, 261.

51. Mackaness G.B. 1962. Gellular resistance to infection. J. Exp. Med., 116, 381.

52. Mackaness G.B. 1964. The immunological basis of acquired resistance. J. Exp. Med., 120, 105.

53. Marra S., Balish E. 1974. Immunity to Candida albicans induced by Listeria monocytogenes. Infect. Immun., 10, 72.

54. Maupas Ph., Bind J.L., Chiron J.P., Darchis J.P. Epidemiologic and pathogenix conception of animal and human listeriosis. Dans "Problems of Listeriosis." Ed. M. Woodbine, Leicester University Press, 1975.

55. McBride M.E., Girard K.F. 1960. A selective method for the isolation of Listeria monocytogenes from mixed bacterial populations. J. Lab. Clin. Med., 55, 153.

56. McIlwain P., Eveleth D.F., Doubly J.A. 1964. Pharmacologic studies of a toxic cellular component of Listeria monocytogenes. Am. J. Vet. Res., 25, 774.

57. Middlebrook G., Salmon B.J., Kreisberg J.I. 1974. Sterilization of Listeria monocytogenes by guinea pig peritoneal exudate cell cultures. Cell. Immunol., 14, 270.

58. Miller J.K., Muraschi T.F. Listerial vaginitis and the interruption of pregnancy in rabbits. Dans "Proceedings of the third International Symposium on Listeriosis." Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Utrecht, 1966.

59. Murray E.G.D., Webb R.A., Swann M.B.R. 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus Bacterium monocytogenes (n. sp.). J. Path. Bact., 29, 407.

60. North R.J. 1963. Some structural aspects of Listeria monocytogenes. J. Ultrastructure Research, 9, 187.

61. Ortel S. 1972. Experience with nalidixic acid-trypaflavine agar. Acta microbiol. Acad. Sci. hung., 19, 363.

62. Osebold J.W. 1965. Distribution of agglutinating antibodies to Listeria monocytogenes among vertebrates. Nature, 207, 209.

63. Osebold J.W., Aalund O. 1968. Interpretation of serum agglutinating antibodies to Listeria monocytogenes by immunoglobulin differentiation. J. infect. dis., 118, 139.

64. Osebold J.W., Aalund O., Chrisp C.E. 1965. Chemical and immunological composition of surface structures of Listeria monocytogenes. J. Bact., 89, 84.

65. Pacheco G., Santos M.L. 1957. Bacterioimpediência de matérias corantes sôbre listérias. Rev. Brasil. Med., 14, 316.

66. Pease P.E. 1967. Tolerated infection with the sub- bacterial phase of Listeria. Nature, 215, 936.

67. Plo J.-P. Contribution à l'étude épidémiologique des listérioses humaines. Thèse Doct. Méd., Toulouse 1975.

68. Ralovich B., Forray A., Mérö E., Malovics H., Szazados I. 1971. New selctive medium for isolation of L. monocytogenes. Zbl. Bact. I Abt. Orig., 216, 88.

69. Robinson B.B., Njoku-Obi N. 1964. Preparation and characterization of a toxic polysaccharide from Listeria monocytogenes. Bacteriol. Proc., p. 82.

70. Rodriguez G.E., McClatchy J.K., Campbell P.A. 1974. Induction of resistance by Listeria monocytogenes cell wall fraction. Infect. Immun., 10, 1163.

71. Schell R.F., Musher D.M. 1974. Detection of nonspecific resistance to Listeria monocytogenes in rabbits infected with Treponema pallidum. Infect. Immun., 9, 658.

72. Seeliger H.P.R. Listeriosis. Ed. Karger, Basel-New York, 1961.

73. Seeliger H.P.R. Serovars of Listeria monocytogenes and other Listeria species. Dans "Problems of Listeriosis." Ed. M. Woodbine, Leicester University Press, 1975.

74. Seeliger H.P.R., Finger H. Analytical serology of Listeria. Dans "Analytical serology of microorganisms." Vol. II. Ed. Kwapinski J.B.G., Interscience Publishers, 1969.

75. Seeliger H.P.R., Sulzbacher F. 1956. Antigenic relationships between Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus. Can. J. Microbiol., 2, 220.

76. Seeliger H.P.R., Welshimer H.J. 1974. Dans "Bergey's manual of determinative bacteriology." 8th ed., p. 593-596., Ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

77. Sethi K.K., Teschner M., Brandis H. 1974. In vitro antilisterial activity of soluble product(s) released from Listeria-immune murine peritoneal macrophages. Infect. Immun., 10, 960.

78. Shimizu K., Otsuka G., Oka M. 1954. Guanofuracin media for isolation of L. monocytogenes and its practical application. Jap. J. Vet. Res., 2, 1.

79. Srivastava K.K., Siddique I.H. 1973. Quantitative chemical composition of peptidoglycan of Listeria monocytogenes. Infect. Immun., 7, 700.

80. Stuart M.R., Pease P.E. 1972. A numerical study on the relationships of Listeria and Erysipelothrix. J. Gen. Microbiol., 73, 551.

81. Stuart S.E., Welshimer H.J. 1973. Intrageneric relatedness of Listeria Pirie. Int. J. Syst. Bacteriol., 23, 8.

82. Stuart S.E., Welshimer H.J. 1974. Taxonomic reexamination of Listeria Pirie and transfer of Listeria grayi and Listeria murrayi to a new genus, Murraya. Int. J. Syst. Bacteriol., 24, 177.

83. Sword C.P. 1966. Mechanisms of pathogenesis in Listeria monocytogenes infection. I. Influence of iron. J. Bact., 92, 536.

84. Trivett T.L., Meyer E.A. 1971. Citrate cycle and related metabolism of Listeria monocytogenes. J. Bact., 107, 770.

85. Tyrrell E.A. 1973. Autolysis of Listeria monocytogenes. J. Bact., 113, 1946.

86. Watson B.B., Lavizzo J.C. 1973. Extracellular antigens from Listeria monocytogenes. II. Cytotoxicity of hemolytic and lipolytic antigens of Listeria for cultured mouse macrophages. Infect. Immun., 7, 753.

87. Weis J. The incidence of Listeria monocytogenes in domestic and wild animals in South-West Germany. Dans "Problems of Listeriosis." Ed. M. Woodbine, Leicester University Press, 1975.

88. Weis J., Seeliger H.P.R. 1975. Incidence of Listeria monocytogenes in nature. Appl. Microbiol., 30, 29.

89. Welshimer H.J., Donker-Voet J. 1971. Listeria monocytogenes in nature. Appl. Microbiol., 21, 516.

90. Welshimer H.J., Meredith A.L. 1971. Listeria murrayi sp. n.: a nitrate-reducing mannitol-fermenting Listeria. Int. J. Syst. Bacteriol., 21, 3.

91. Wilder M.S., Lubin D.J. 1973. Platelet enhancement of postphagocytic destruction of Listeria monocytogenes in cultured mouse peritoneal macrophages. Infect. Immun., 8, 843.

92. Wilder M.S., Sword C.P. 1967. Mechanisms of pathogenesis in Listeria monocytogenes infection. II. Characterization of listeriosis in the CD-1 mouse and survey of biochemical lesions. J. Bact., 93, 531.

93. Wilder M.S., Sword C.P. 1967. Mechanisms of pathogenesis in Listeria monocytogenes infection. III. Carbohydrate metabolism. J. Bact., 93, 538.

94. Wilkinson T.R., Hall E.R. 1971. Rapid method for the isolation of Listeria monocytogenes from experimentally infected mice. Appl. Microbiol., 21, 112.

95. Winblad S., Borglin N.E. 1963. Studies of human listeriosis. 2. Antibody titres in healthy people and patients of different categories. Acta path. et microbiol. scandinav., 58, 133.

96. Zinkernagel R.M., Pang T., Blanden R.V. 1975. Effect of cell dose and dose of infectious agent on expression of protection against Listeria monocytogenes and ectromelia virus in cell transfer models. Infect. Immun., 11, 1170.

ISBN 3 260 04279 2